

Expression von verschiedenen
Proteinversionen von Blown fuse sowie
Skap2 im Embryo und die mögliche Rolle
von Blown fuse in der Myoblastenfusion in
Drosophila melanogaster

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Angela Sickmann
aus Siegen

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Gutachter der Arbeit waren:

Erstgutachterin: Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. U. Mösch

Termin der mündlichen Prüfung:

Teile der Arbeit werden in folgenden Arbeiten veröffentlicht

- Önel, S.F., Dottermusch, C., Sickmann, A., Buttgereit, D. und Renkawitz-Pohl. Role of the Actin Cytoskeleton within the FuRMAS during *Drosophila* myoblast fusion and the first common players in vertebrates. in: Cell fusions: regulation and control, Lars-Inge Larsson (Editor). Springer Verlag. Eingeladener Übersichtsartikel, einzureichen am 11. Februar 2010.
- Önel, S.F., Buttgereit, D., Schäfer, G., Berger, S., Sickmann, A., Susic, L., Berger, S., Kesper, D.A., Stute, C. und Renkawitz-Pohl, R. (2010). In fusion competent cells of *Drosophila*, Blow is a mediator between successful cell adhesion and actin branching during myoblast fusion. In Vorbereitung.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	9
2	Einleitung	10
2.1	Die Muskulatur von <i>Drosophila melanogaster</i> ist ein gut geeignetes Modellsystem zur Analyse der Muskelentwicklung	10
2.2	Der Fusionsprozess und die wichtigsten daran beteiligten Gene	11
2.2.1	Für die Myoblastenfusion sind zwei Zelltypen notwendig, die durch laterale Inhibition determiniert werden	11
2.2.2	Die Morphologie des somatischen Myoblastenfusionsprozesses . .	12
2.2.3	Der Fusionsprozess wird durch ultrastrukturelle Merkmale charakterisiert	13
2.2.4	Am Fusionsprozess sind viele Proteine beteiligt, deren Funktion noch nicht in allen Fällen geklärt werden konnte	14
2.3	Bei der Myoblastenfusion tritt eine Kontaktstruktur auf, die der immunologischen Synapse im prinzipiellen Aufbau ähnelt	18
2.3.1	Die Proteine Skap-55 und ADAP spielen eine Rolle im Aufbau der immunologischen Synapse	21
2.4	Das PH-Domänen Protein Blown fuse spielt eine zentrale Rolle in der Myoblastenfusion	22
2.4.1	PH-Domänen sind häufig für die Rekrutierung der Proteine an Zellmembranen nötig	24
2.4.2	Blows genetischer Interaktionspartner Kette ist in anderen Entwicklungssystemen Teil eines Aktin-Regulationskomplexes . . .	25
2.5	Die Tyrosin-Kinase Abelson ist ein Kandidat für eine mögliche Blow-Phosphorylierung	26
2.6	Crk könnte in der Myoblastenfusion im gleichen Signalweg wie Blow agieren	27

3	Aufgabenstellung	29
4	Material und Methoden	30
4.1	Material und Methoden - Material	30
4.1.1	Geräte	30
4.1.2	Chemikalien	31
4.1.3	Enzyme und Kits	33
4.1.4	Antikörper und Seren	34
4.1.5	Bakterien- und Hefestämme sowie Plasmide	34
4.1.6	Materialien für den Hefe-2-Hybrid-Interaktionstest	35
4.1.7	Materialien für SDS-PAGEs	35
4.1.8	Nähr- und Zuchtmedien	36
4.1.9	Fliegenstämme	37
4.1.10	synthetisierte Oligonukleotide (Primer)	38
4.1.11	Puffer und Lösungen für Plasmidpräparationen	40
4.1.12	Puffer und Lösungen für Antikörper-Färbungen	41
4.1.13	Puffer und Lösungen für <i>in situ</i> Hybridisierungen	41
4.1.14	Puffer und Lösungen für Zellkultur	42
4.1.15	sonstige Puffer und Lösungen	43
4.1.16	Computer Software sowie Internet-Seiten	43
4.2	Material und Methoden - Fliegenhaltung	44
4.2.1	Stammhaltung von <i>Drosophila melanogaster</i>	44
4.2.2	Sammlung von <i>Drosophila melanogaster</i> -Embryonen	44
4.2.3	P-Element Keimbahntransformationen von <i>Drosophila</i> -Embryonen	45
4.2.4	Etablierung transgener Fliegenlinien	45
4.3	Material und Methoden - histologische Methoden	46
4.3.1	Fixierung der <i>Drosophila melanogaster</i> -Embryonen	46
4.3.2	Immunhistologie an <i>Drosophila melanogaster</i> -Embryonen	47
4.3.3	Whole-mount <i>in situ</i> -Hybridisierung mit RNA-Sonden	47
4.4	Material und Methoden - Zellkultur	49
4.4.1	Kultivierung von Zellen	49
4.4.2	Das Aussähen von eingefrorenen Zellen	49
4.4.3	Die Transfektion von Zellen	49
4.4.4	Antigen Nachweis an Zellen	50
4.5	Material und Methoden - molekulare Methoden	51

4.5.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	51
4.5.2	Single Embryo PCR an mutanten Embryonen	52
4.5.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	52
4.5.4	Klonieren mit dem TOPO TM -TA-Vektor-Kit	52
4.5.5	Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab und Restriktionsverdau	53
4.5.6	Plasmid-Präparation im präparativen Maßstab	54
4.5.7	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	54
4.5.8	Restriktionsverdau	54
4.5.9	Elution der DNA aus dem Gel	55
4.5.10	Ethanol-Fällung der DNA	55
4.5.11	Behandlung mit alkaliner Phosphatase (CIP)	55
4.5.12	Ligation von DNA-Fragmenten	55
4.5.13	Transformation in chemisch kompetente Zellen	56
4.5.14	Die Theorie des CytoTrap Vector Kits, Stratagene	56
4.5.15	Herstellung kompetenter cdc25H-Hefezellen und deren Transformation	57
4.5.16	SDS-PAGE	58
5	Ergebnisse	60
5.1	In <i>blow</i> ² -mutanten Embryonen kann immunhistologisch kein Blow-Protein detektiert werden	60
5.2	Die <i>blow</i> ² -Mutante weist eine Deletion im zweiten Exon auf	61
5.3	Die <i>in silico</i> -Analysen der Aminosäure-Sequenz von Blow zeigen viele Phosphorylierungs- und Bindemotive	63
5.3.1	Die Suche nach putativen Phosphorylierungsstellen in Blow	64
5.3.2	Die Suche nach Protein-Protein-Bindemotiven	65
5.4	Blow Δ N-113 interagiert nicht mit der Spleißvariante CrkS des Adaptorproteins Crk	70
5.4.1	Etablierung des Cyto Trap-Hefe-2-Hybrid-Systems zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen	71
5.4.2	Weder Blow Δ N-113 noch Blow Δ N-113-Y342H zeigen im Cyto Trap-System Interaktionen mit CrkS	71
5.5	Transgene Fliegen mit UAS-Konstrukten erlauben die ektopische Expression von verschiedenen Blow-Varianten	73

5.5.1	Die Generierung verschiedener UAS- <i>blow</i> -Konstrukte	74
5.5.2	Die ektopisch exprimierten Proteine können immunhistologisch nachgewiesen werden	75
5.5.3	Die <i>wg</i> -Gal4 vermittelte Expression von UAS- <i>blow-PH</i> führt zu keinem nachweisbaren Protein	77
5.5.4	Unterschiedliche Gal4-Treiberstämme ermöglichen eine Expression der Blow-Varianten in verschiedenen Expressionsmustern .	77
5.5.5	Die ektopische Expression der Blow-Varianten stört die Entwicklung der embryonalen Muskulatur nicht	78
5.6	Rettungsexperimente des <i>blow²</i> -Phänotyps mit verschiedenen Blow-Varianten	79
5.6.1	UAS- <i>blowFL</i> und UAS- <i>blowΔN-113</i> retten den <i>blow²</i> -Phänotyp nicht	79
5.6.2	Die putative Spleißvariante <i>blow-C</i> wird im Embryo nicht transkribiert	81
5.7	Das Blow-Protein lokalisiert in verschiedenen Mutanten noch in den FuRMAS	83
5.7.1	Zell-Zell-Adhäsionen sind essentiell für die Blow-Lokalisationen an die Membran	83
5.8	Die evolutionäre Konservierung von <i>blow</i>	86
5.8.1	Diverse <i>Drosophila</i> -Spezies weisen Orthologe zu <i>blown fuse</i> auf .	86
5.8.2	Ist Blow ein Ortholog von Skap2?	87
5.9	Die <i>in silico</i> -Analyse von Skap2 findet Tyrosin 241 als Phosphorylierungsstelle in verschiedenen Bindemotiven	88
5.9.1	Die Suche nach putativen Phosphorylierungsstellen in Skap2 . .	88
5.9.2	Die Suche nach Protein-Protein-Bindemotiven in Skap2	89
5.10	Expressionen von <i>skap2</i> im <i>Drosophila</i> -Embryo können keine Funktionalität des Proteins in der Fliege beweisen	91
5.10.1	<i>skap2</i> kann in Fliegenembryonen exprimiert werden	91
5.10.2	Die ektopische Expression von Skap2 stört die Myoblastenfusion von <i>Drosophila</i> nicht	92
5.10.3	Skap2 beeinflusst den <i>blow²</i> -mutanten Phänotyp nicht	93
6	Diskussion	94
6.1	In <i>blow²</i> -Embryonen wird kein Blow exprimiert und die Myoblastenfusion stoppt nach der Ausbildung des Präfusionskomplexes	94

6.2	Die Sequenzierung von <i>blow</i> ² zeigt eine Deletion von 271 bp sowie drei Basenaustausche auf	95
6.3	Blow könnte der <i>in silico</i> -Analyse nach mit verschiedenen Proteinen interagieren; dabei scheint das Tyrosin 342 eine besonders wichtige Rolle zu spielen	97
6.3.1	Eine Phosphorylierung von Tyrosin 342 scheint sehr wahrscheinlich	97
6.3.2	Ein Adaptorprotein, z. B. Dock, nicht aber Crk, könnte über eine Interaktion mit Blow weitere Schlüsselproteine zu den FuRMAS rekrutieren	98
6.4	Durch die Expression von <i>blowFL</i> und <i>blowΔN-113</i> konnte der <i>blow</i> ² -Phänotyp nicht gerettet werden	101
6.5	Duf-, Rst- und Sns-unabhängige Zelladhäsionen reichen aus, um Blow an Zellkontakten zu konzentrieren	104
6.5.1	Die Expression von Blow-PH konnte nicht nachgewiesen werden	108
6.6	Eine funktionelle Homologie von Blow und Zebrafisch Skap2 konnte nicht nachgewiesen werden	109
6.6.1	Neben Blow könnten auch Abi oder Dock Skap2-Orthologe in der <i>Drosophila</i> -Myoblastenfusion sein	109
6.6.2	Eine Expression von <i>skap2</i> im Mesoderm des <i>Drosophila</i> -Embryos stört nicht die wildtypische Entwicklung und mildert nicht den <i>blow</i> ² -Phänotyp	110
6.7	Ausblick und Modell: Die putative Interaktion von Blow und Abelson als Startsignal für die Aktinreorganisation	111
7	Abkürzungen	116
8	Literatur	118
9	Anhang	131
10	Danksagung	145
11	Erklärung	146
12	Lebenslauf	147

1 Zusammenfassung

Die Myoblastenfusion in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* verläuft in zwei Schritten. Das Blow-Protein ist essentiell für den Verlauf des zweiten und teilweise auch für den Verlauf des ersten Schrittes. *blow²*-Embryonen weisen einen sehr starken Fusionsdefekt auf. Durch Immunhistologie mit einem anti-Blow-Antikörper gegen den N-Terminus des Proteins konnte gezeigt werden, dass keinerlei Restprotein in den *blow²*-Embryonen detektierbar ist. Eine Sequenzierung des Allels hat schließlich gezeigt, dass das *blow²*-Allel eine Deletion vom zweiten Intron bis ins zweite Exon von *blow* tragen, was zur Degradation der mRNA führt. Es handelt sich bei *blow²* also um ein Null-Allel.

Um dem Verständnis der Funktion des Proteins näherzukommen, wurden Blow-Konstrukte hergestellt, in denen bei *in silico*-Analysen gefundene Merkmale des Proteins verändert wurden: Da neben einer PH-Domäne ein putatives Phosphorylierungs- und Interaktionsmotiv um Tyrosin 342 aufgezeigt wurde, wurden Blow-Versionen im Embryo exprimiert, die diese Merkmale verändert tragen. Dabei zeigten weder die Expression von N-terminal verkürztem Blow noch von Blow mit mutiertem Tyrosin 342 einen Defekt bei ektopischer Expression in Founderzellen. Auch eine Expression von einem Konstrukt mit phosphomimetisch verändertem Tyrosin 342 oder mit deletierter PH-Domäne hat zu keiner Störung der Myoblastenfusion geführt. Überraschenderweise führt die Expression von wildtypischem Blow nicht zur Rettung des *blow²*-Phänotyps.

Eine Analyse von Blow-Lokalisationen in verschiedenen Fusionsmutanten hat zeigen können, dass die Akkumulation von Blow an der Fusionsstelle von der Adhäsion der Fusions-kompetenten Myoblaste und dem Aktinregulator Arp3 abhängt. Trotz Abwesenheit von Adhäsionsmolekülen gibt es gelegentlich Blow-Foci an Zellkontakten.

Schließlich wurde das postulierte Blow-Ortholog Skap2 aus Zebrafisch auf die Funktionalität im Fliegenembryo untersucht. Dabei konnte weder eine Rettung des *blow²*-Phänotyps, noch eine Störung der Myoblastenfusion bei Expression im wildtypischen Hintergrund festgestellt werden, so dass eine Orthologie der beiden Proteine weiterhin spekulativ bleibt.

2 Einleitung

2.1 Die Muskulatur von *Drosophila melanogaster* ist ein gut geeignetes Modellsystem zur Analyse der Muskelentwicklung

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist ein häufig verwendeter Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie, da sie einfach und kostengünstig zu halten ist, über eine kurze Generationszeit, viele Nachkommen und ein kleines Genom verfügt und mit genetischen Methoden gut zugänglich ist. Auch zur Untersuchung der Muskulaturentwicklung ist die Fruchtfliege geeignet. Die Muskulatur der Fliege ist mesodermalen Ursprungs und unterteilt sich im Embryo in drei Arten von Muskeltypen: Die somatische Körperwandmuskulatur (Bewegungsmuskulatur), die viszerale Muskulatur um den Darm herum und die Herzmuskulatur. Dabei unterscheidet sich die Herzmuskulatur von den beiden anderen Muskeltypen dadurch, dass sie aus mononukleären Zellen besteht, während die anderen Muskeltypen durch Fusionen aus Myoblasten entstehen (Übersichtsartikel Abmayr et al., 2005; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).

Die Myogenese der *Drosophila*-Muskulatur gliedert sich in drei Schritte: Erstens die Determination der Myoblastenpopulationen, zweitens die Fusion der Myoblasten und drittens Wachstum, Streckung, Etablierung der Sarkomere und Anheftung der Muskeln. Gegenstand dieser Arbeit ist die Zellfusion zur Etablierung der somatischen Körperwandmuskulatur. Das Ergebnis dieser Entwicklung ist ein streng geordnetes Muster, das sich in den abdominalen Hemisegmenten wiederholt: 30 nach Lage, Größe, Orientierung und Verankerung genau definierte Muskeln machen es möglich, Defekte in der Muskulatur genau zu erkennen und zu beschreiben. Nach der Fusion werden die Muskeln mit Hilfe von Integrinen an der Epidermis verankert (Übersichtsartikel Abmayr et al., 2005; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).

Die somatischen Muskeln der Fliege sind in ihrem grundsätzlichen Aufbau den Myofibrillen der Vertebraten ähnlich (Knudsen, 1992, Wakelam, 1985), allerdings besteht in *Drosophila* ein Muskel nur aus einer einzigen Myotube und nicht aus mehreren Mus-

kelfasern, wie das bei höheren Wirbeltieren der Fall ist. Da inzwischen auch bekannt ist, dass mehrere für die Fusion essentielle *Drosophila*-Proteine in Vertebraten konserviert sind (Moore et al., 2007; Srinivas et al., 2007; Übersichtsartikel Magbool und Jagla, 2007), erscheint es wahrscheinlich, dass die Fliegenmuskulatur als Modell für die Vertebratenmuskulatur dienen kann und dass Ergebnisse aus der Fliegenforschung wichtige Hinweise für den Erkenntnisgewinn in der medizinischen Muskelforschung, z.B. bezüglich Muskeldystrophien, geben können.

2.2 Der Fusionsprozess und die wichtigsten daran beteiligten Gene

2.2.1 Für die Myoblastenfusion sind zwei Zelltypen notwendig, die durch laterale Inhibition determiniert werden

Für die Entwicklung der Muskulatur in *Drosophila*-Larven sind zwei verschiedene Zelltypen nötig, die miteinander fusionieren; die Gründer- oder Founderzellen (FC) und die Fusions-kompetenten Myoblasten (FCM). Diese Zellen entstehen aus Mesoderm-bereichen, die eine hohe Konzentration des Transkriptionsfaktors Twist aufweisen. In diesen Bereichen entstehen Zellcluster, die den Transkriptionsfaktor 'Lethal-of-scute' (L'Sc) exprimieren. Durch Notch-abhängige laterale Inhibition entstehen innerhalb dieser Cluster die sogenannten Progenitorzellen (Muskelvorläuferzellen) und die FCMs. Die Progenitorzelle teilt sich anschließend durch asymmetrische Zellteilung in zwei Founderzellen oder in eine Vorläuferzelle für die adulte Muskulatur und eine Founderzelle. Die Founderzellen gelten als Ursprungszellen der werdenden Muskeln und tragen durch die Kombination der exprimierenden Transkriptionsfaktoren die Identitätsinformationen der jeweiligen Muskeln in sich (Übersichtsartikel Paululat et al., 1999, Frasch und Leptin, 2000; Dworak und Sink, 2002; Abmayr et al., 2005; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).

Im Gegensatz zu den Founderzellen ist das Schicksal der FCMs nicht vor der Fusion festgelegt. Zunächst exprimieren die FCMs den Transkriptionsfaktor 'Lame Duck' (Lmd), dessen Expression aber eingestellt wird, sobald die FCM fusioniert ist. Anschließend wird die Expression des FCM-Kerns im Syncytium auf die Kombination von Transkriptionsfaktoren der Founderzelle reprogrammiert (Übersichtsartikel Baylies et al., 1998, Paululat et al., 1999).

2.2.2 Die Morphologie des somatischen Myoblastenfusionsprozesses

Die nun determinierten Myoblasten beginnen mit dem Fusionsprozess. Dabei ist jede Fusion durch eine initiale Zell-Zell-Erkennung gekennzeichnet, die von einer Zell-Zell-Adhäsion, der Fusion und schließlich von der Integration des FCMs in die Founderzelle gefolgt wird (Abb. 2.1). Der gesamte Fusionsprozess dauert ca. 5,5 Stunden und findet während der Entwicklungsstadien 12 bis 16 statt; die einzelne Fusion verläuft innerhalb von Minuten (7,5 bis 13 Stunden nach Eiablage. Beckett und Baylies, 2007).

Rau et al. (2001) und Schröter et al. (2004) haben postuliert, dass die Myoblastenfusion in *Drosophila* in zwei Schritten stattfindet. In diesem Modell fusioniert im ersten Schritt eine Founderzelle mit ein bis zwei FCMs und bildet dadurch eine größere, mehrkernige Precursorzelle (PC). Im zweiten Fusionsschritt rekrutiert die PC dann eine für sie spezifische Anzahl weiterer FCMs, mit denen sie fusioniert bis die finale Größe des Muskels erreicht ist. Dieses Modell stützt sich u. a. auf die Beobachtung, dass es zwei Klassen von Mutanten gibt: Die, die gar keine Fusionen mehr zeigen und somit im ersten Fusionsschritt stoppen und jene, die im zweiten Schritt stoppen und die Precursorzelle mit zwei bis drei Kernen noch ausbilden können (Abb. 2.1).

In 2007 haben Beckett und Baylies ein alternatives Modell aufgestellt, in dem sie postuliert haben, dass es zwar tatsächlich zwei zeitliche Phasen der verstärkten Fusion gibt, dass darüber hinaus aber die Mutanten, die nur eine limitierte Anzahl von Fusionen machen können, nicht zwangsläufig nach einem klar definierten ersten Schritt in ihrer Entwicklung stoppen. Dafür spricht, dass der Zeitraum in denen diese Mutanten fusionieren, sich über den gesamten Zeitraum der Fusionen erstreckt und dass manche Hemisegmente gar keine Fusionen zeigen. Im Gegensatz zu dem Modell von Rau et al. und Schröter et al. muss es in dem zweiten Modell keinen Unterschied zwischen den benötigten Proteinen im ersten und zweiten Schritt geben. Vielmehr könnten die gleichen Proteine für die beiden Fusionsphasen verwendet werden. Diese Theorie kann allerdings nicht die Phänotypen verschiedener Doppelmутanten erklären (Übersichtsartikel Önel, 2009).

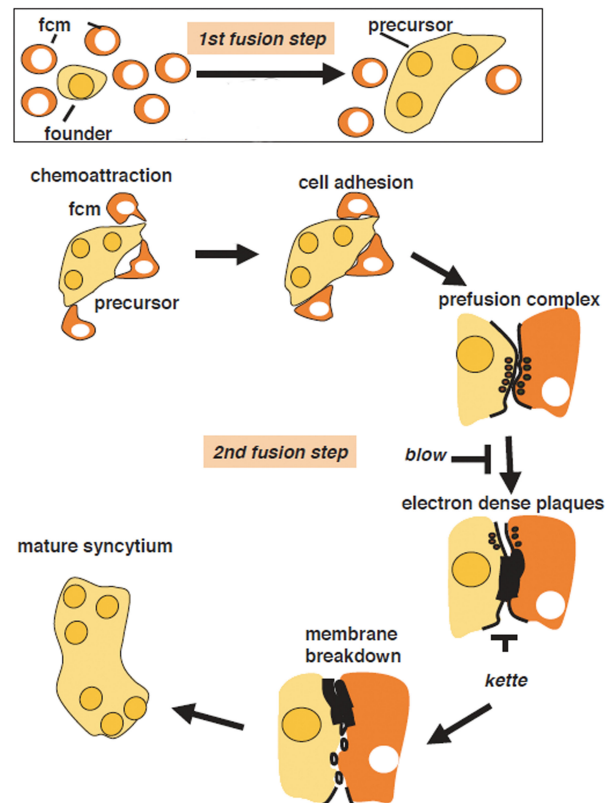


Abbildung 2.1: Der Ablauf der Myoblastenfusion in zwei Fusionschritten. Dargestellt ist der zweistufige Fusionsprozess nach Rau et al., 2001 und Schröter et al., 2004. Dabei fusioniert die Founderzelle im ersten Schritt mit ein bis zwei FCMs, was zu einer zwei bis dreikernigen Precursorzelle führt. Im zweiten Schritt fusioniert diese Precursorzelle mit weiteren FCMs bis die charakteristische Kernzahl der Myotube erreicht ist. Die Zell-Zell-Erkennung und -Adhäsion, die Bildung des Präfusionskomplexes und der elektronendichten Plaques sowie der Membranabbau sind für den zweiten Schritt der Fusion beschrieben worden (Abbildung verändert nach Schröter et al., 2004).

2.2.3 Der Fusionsprozess wird durch ultrastrukturelle Merkmale charakterisiert

Doberstein et al. (1997) haben durch Transmissionselektronen-Mikroskopie ultrastrukturelle Merkmale in der zweiten Fusionsphase beobachten können (Abb. 2.1). Wenn sich die beiden fusionierenden Zellen flächig aneinander gelagert haben, entstehen an den Kontaktstellen der beiden Zellen paarweise elektronendichte Vesikel, die sich häufig gegenüber von einander anordnen und den sogenannten Präfusionskomplex bilden. Doberstein et al. haben auch elektronendichte Verbindungen, die den interzellulären Spalt überbrücken und möglicherweise für die Paarung der Vesikel verantwortlich sind, beobachtet. Ein einzelner Vesikel hat einen Durchmesser von ca. 40 nm und der Präfusionskomplex erstreckt sich über eine Fläche von $1 \mu\text{m}^2$.

In Embryonen in späteren Stadien lassen sich an der Kontaktstelle in beiden fusionierenden Zellen elektronendichte Plaques von etwa 500 nm Länge finden, zwischen denen elektronendichte Verbindungen bestehen. Bis heute konnte nicht geklärt werden, woraus die elektronendichten Strukturen bestehen und was ihre Funktion in der Myoblastenfusion ist. Eine Theorie von Doberstein et al. (1997) besagt, dass die elektronendichten Vesikel in die Plaques übergehen und dass die Vesikel essentielle Komponenten des Fusionsapparates enthalten. Die Paarigkeit des Präfusionskomplexes hätte demnach die Funktion, eine symmetrische Fusion zu gewährleisten und die Fläche der Fusion einzuschränken. Da vergleichbare elektronendichte Strukturen auch in Myoblasten-Zellkulturen anderer Tiere, wie Ratten und Wachteln, beobachtet wurden (Rash und Fambrough, 1973; Lipton und Königsberg, 1972) könnte es sich dabei um konservierte Merkmale handeln, die artübergreifend eine Fusion vermitteln.

In Embryonen, bei denen die Fusion schon stattgefunden hat, konnte Doberstein den Membranabbau dokumentieren, der ein zytoplasmatisches Kontinuum schafft und bei dem abgebautes Membranmaterial in Form von Membranvesikeln sichtbar wird.

2.2.4 Am Fusionsprozess sind viele Proteine beteiligt, deren Funktion noch nicht in allen Fällen geklärt werden konnte

Während der letzten Jahre wurde intensiv an der Myoblastenfusion von *Drosophila* geforscht, so dass eine zunehmende Anzahl an relevanten Genen entdeckt werden konnte.

Am Anfang der Fusion steht die Erkennung von Founderzelle (oder Precursorzelle) und FCM. Es wurde gezeigt, dass vor allem zwei Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) für die Erkennung und Adhäsion nötig sind. Die Precursor-/Founderzelle exprimiert das membranständige Protein Dumbfounded/Kin of irre (Duf/Kirre), dessen extrazelluläre Domäne als Chemoattraktant für die FCMs dient (Ruiz-Gomez et al., 2000). Als Gegenpart exprimieren die FCMs das Oberflächen-Protein Sticks and Stones (Sns; Bour et al., 2000). Die extrazellulären Domänen der beiden Proteine können miteinander interagieren und so den Kontakt und die Adhäsion der beiden Zelltypen schaffen (Abb. 2.2, Galletta et al., 2004; Übersichtsartikel Dworak und Sink, 2002). Die intrazellulären Domänen der Proteine spielen vermutlich eine Rolle bei der Signaltransduktion, wie für den Fall von Duf schon gezeigt wurde (Rau et al., 2001; Chen und Olson, 2001). Neben diesen beiden Membranproteinen gibt es noch zwei weitere Oberflächen-Proteine, die an der Etablierung des Zell-Zell-Kontaktes beteiligt sein können. Hibris wird - ähnlich wie Sns - in FCMs exprimiert und kann bei starker Über-

expression dessen Funktion teilweise ersetzen (Artero et al., 2001; Shelton et al., 2009). Roughest (Rst) ist ein Paralog von Duf, wird aber in beiden Zelltypen exprimiert (Abb. 2.2). Da nur eine Doppelmutante von *duf* und *rst* einen Muskelfusionsdefekt zeigt, scheinen die beiden Proteine funktional redundant zu wirken (Strünkelnberg et al., 2001). Ähnlich wie in *sns*-Mutanten entsteht durch Deletion von *duf* und *rst* ein kompletter Fusionsstopp. Zwar werden von den FCMs noch Filopodien gebildet, diese können sich ohne Duf oder Rst aber nicht mehr zu den Founderzellen orientieren, so dass kein Kontakt mehr zwischen den Zellen hergestellt werden kann (Ruiz-Gomez et al., 2000). Die Funktion von Rst in den FCMs konnte bislang noch nicht geklärt werden.

Nach der Interaktion der Adhäsionsmoleküle kommt es sowohl in den FCMs als auch in den Founderzellen zu einer Signaltransduktion, die schließlich zur Fusion führt. Während der Fusion findet eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts statt, die für den morphologischen Umbau der Zellen erforderlich ist (Übersichtsartikel Önel, 2009). Es sind verschiedene Proteine identifiziert worden, die Teil der Signaltransduktionsketten sind, allerdings ist das Zusammenspiel der Moleküle bislang noch nicht vollständig verstanden.

Unter den Proteinen, deren Mutanten gar keine Fusionen mehr durchführen ist der Guanine-Nucleotide-Exchange-Faktor (GEF) 'Myoblast city' (Mbc, Abb. 2.2). Offensichtlich ist Mbc für den ersten Schritt bzw. die frühen Fusionen der Myogenese notwendig. Mbc ist das Homolog des Vertebratenproteins DOCK180 und verfügt über eine SH3-Domäne, eine Docker-Domäne und mehrere Crk-Bindemotive (Erickson et al., 1997; Nolan et al., 1998; Rushton et al., 1995). Es wurde in zahlreichen Veröffentlichungen belegt, dass Mbc zusammen mit einem anderen Protein (ELMO) zumindest in Vertebraten und *Caenorhabditis elegans* die kleine GTPase Rac reguliert (Nolan et al., 1998, Kiyokawa et al., 1998; Guimienny et al., 2001; Brugnera et al., 2002; Cote und Vuori et al., 2002). *rac1*, *rac2*-Doppelmutanten zeigen in *Drosophila* einen Myoblastenfusionsdefekt, so dass davon auszugehen ist, dass Rac eine Rolle in der Myoblastenfusion spielt.

Parallel zu der möglichen Rac-Aktivierung durch einen Mbc-Signalweg ist auch eine Aktivierung durch das Protein Schizo/Loner denkbar (Abb. 2.2). Schizo wurde in der Neurogenese entdeckt (Hummel et al., 1999; Önel et al., 2004) und scheint nur in Founderzellen, nicht aber in FCMs exprimiert (Chen et al., 2003), was allerdings kürzlich in Frage gestellt wurde, da auch Protein in den FCMs detektiert werden konnte

(Richardson et al., 2007). Das Protein weist eine PH-Domäne und eine Sec7-Domäne auf. Während PH-Domänen meist für die Lokalisation an Membranen wichtig sind (Übersichtsartikel Lemmon, 2008), scheint die Sec7-Domäne für die Interaktion mit der kleinen GTPase ARF6 verantwortlich zu sein (Übersichtsartikel Donaldson und Jackson, 2000). Schizo/Loner-Mutanten zeigen ähnlich wie Mbc-Mutanten keine Fusionen mehr (Beckett und Baylies, 2007). Parallel zu der Mbc-vermittelten Rac-Aktivierung könnte auch ARF6 die Aktivierung von Rac übernehmen (Chavrier und Goud, 1999; Radhakrishna et al., 1996). Hier scheint aber eine funktionelle Redundanz vorzuliegen, denn in ARF6-Mutanten entwickeln sich die Muskeln wildtypisch (Dyer et al., 2007). Hier scheint eine funktionelle Redundanz zu einer Arf GTPase vorzuliegen, denn in ARF6-Mutanten entwickeln sich die Muskeln normal (Dyer et al., 2007).

Downstream von Rac führen beide Signalwege zu Aktin-Regulatoren. Für den ersten Fusionsschritt/die erste Phase der Fusionen ist das Mitglied der WASP-Proteinfamilie SCAR/WAVE postuliert worden (Abb. 2.2, Berger et al, 2008; Übersichtsartikel Önel, 2009). Durch Analysen von Doppelmutanten konnte gezeigt werden, dass Fliegen, die eine Mutation in *scar/wave* und einem weiteren Gen, nämlich *wip/vrp1/sltr*, tragen, gar keine Fusionen mehr vollenden können. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass WAVE in Redundanz zu WIP/Vrp1/Sltr für den ersten Fusionsschritt bzw. für frühe Fusionen notwendig ist (Übersichtsartikel Önel, 2009). SCAR/WAVE ist ein Aktin-Regulator, der über die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes die Aktinpolymerisation steuert. Vrp1/WIP/Sltr wird nur in FCMs exprimiert und kann sowohl an Aktin als auch an den Aktinregulator Wasp binden. In GST-Pulldown-Experimenten interagiert WIP/Vrp1/Sltr außerdem mit Crk (siehe 2.6, Kim et al., 2007).

Für die Theorie des zweistufigen Fusionsprozesses spricht, dass Mutanten beschrieben wurden, deren Muskeln nach der Ausbildung von zwei- bis dreikernigen Precursorzellen in der Entwicklung stoppen. Eine dieser Mutanten ist das Multidomänenprotein 'Rolling pebbles/Antisocial' (Rols, Abb. 2.2). Rols ist in den Precursorzellen exprimiert und interagiert dort mit der intrazellulären Domäne des Adaptorproteins Duf (Chen und Olson, 2001). Rau et al. konnten 2001 zeigen, dass Rols für die Rekrutierung weiterer FCMs über das Precursorstadium hinaus essentiell ist. Rols kann parallel zu Duf eventuell auch mit Mbc interagieren und so Mbc zu definierten Punkten an der Zellmembran rekrutieren an denen eine Aktin-Reorganisation erforderlich ist (Chen und Olson, 2001). Darüber hinaus kann Mbc mit dem SH2/SH3-Adaptorprotein Crk interagieren (Galletta et al., 1999; Nolan et al., 1998; 2.6).

In den FCMs ist Rols nicht exprimiert. Bislang konnte kein Protein gefunden werden, dass über eine Bindung an die intrazelluläre Domäne des Adhäsionsproteins Sns die Signaltransduktion in FCMs starten kann.

Ein Gen, das nur in den FCMs exprimiert wird, ist das Gen *blown fuse* (*blow*; Abb. 2.2, Schröter et al., 2006). Doberstein et al. haben 1997 das Gen gefunden und beschrieben, dass in *blow*-Mutanten teilweise noch Precursorzellen und Präfusionskomplexe ausgebildet werden. Durch Schröter et al., 2004 ist bekannt, dass Blow genetisch mit dem Aktinregulator Kette interagiert. Blow liegt im Fokus dieser Arbeit und wird in einem eigenen Kapitel thematisiert (2.4). Kette wurde zunächst als essentiell für die Entwicklung des Zentralen Nervensystems beschrieben (Hummel et al., 1999 und 2000). *In vivo* liegt Kette in verschiedenen Entwicklungssystemen in einem physikalischen Komplex mit Sra-1 und dem Abelson-interactor (Abi) vor (Eden et al., 2002; Bogdan und Klämbt, 2003, siehe unten). In der Myoblastenfusion stoppen *kette*-Mutanten nach der Ausbildung von durchschnittlich zweikernigen Muskelzellen (Schröter et al., 2004; Beckett und Baylies, 2007). Im Elektronenmikroskop lassen sich elektronendichte Vesikel und vergrößerte Plaques entdecken und in Rettungsexperimenten kann die Expression von Kette den *blow*-Phänotyp partiell retten, so dass geschlussfolgert wurde, dass Kette nach Blow wirkt (Schröter et al., 2004). Kette ist in der Regulation von SCAR/WAVE und Wasp involviert (Abb.2.2). Dabei agiert Kette in der Myoblastenfusion als positiver Regulator von SCAR/WAVE, was daraus geschlossen wurde, dass Scar in *kette*-Mutanten nicht mehr exprimiert wird bzw. dass Reste des SCAR/WAVE-Proteins in *kette*-Mutanten nicht mehr lokalisieren (Richardson et al., 2007). Andererseits gilt Kette in der *Drosophila*-Myoblastenfusion als Antagonist von Wasp, was durch Gendosisexperimente gezeigt werden konnte (Schäfer et al., 2007). Kürzlich wurde postuliert, dass SCAR/WAVE und Wasp nacheinander in der Myoblastenfusion agieren. Durch Epistasis-Experimente wurde gezeigt, dass Wasp nach der Bildung der Fusionspore und nach der Funktion von Kette und SCAR/WAVE agiert (Berger et al., 2008; Gildor et al., 2009). Dabei wurde postuliert, dass SCAR/WAVE für die Bildung der Pore verantwortlich ist, während Wasp die vollständige zytoplasmatische Kontinuität vorantreibt (Gildor et al., 2009).

Ein Gen, das bisher noch gar nicht in die Signalkaskaden eingeordnet werden konnte, ist das Gen *singles bar* (*sing*, Estrada et al., 2007). *In situ*-Hybridisierungen haben gezeigt, dass das Gen in Founderzellen und FCMs exprimiert wird. Das Protein besteht aus mehreren Transmembrandomänen und enthält eine MARVEL-Domäne, die

häufig mit membranassoziierten Vorgängen in Verbindung gebracht wird. *sing*-mutante Embryonen zeigen viele unfusionierte Myoblasten; aber die Determination der Zelltypen sowie die Zell-Zell-Erkennung und -Adhäsion sind nicht gestört. Da *sing*-Mutanten noch zweikernige Zellen ausbilden, stoppt die Mutante in dem Zwei-Schritt-Modell erst im zweiten Schritt bzw. nach der ersten Phase der Fusionen. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt, dass in der Mutante mehr Präfusionskomplexe ausgebildet werden als im Wildtyp oder in *blow*-mutanten Embryonen (Estrada et al., 2007). Falls Dobersteins Theorie stimmt und sich die im Elektronenmikroskop beobachteten Vesikel zu elektronendichten Plaques auflösen oder diese Vesikel mit der Membran fusionieren, könnte Sing eine Komponente sein, die für die Auflösung der Vesikel essentiell ist, so dass ohne das Protein eine Akkumulation der Vesikel stattfindet (Estrada et al., 2007).

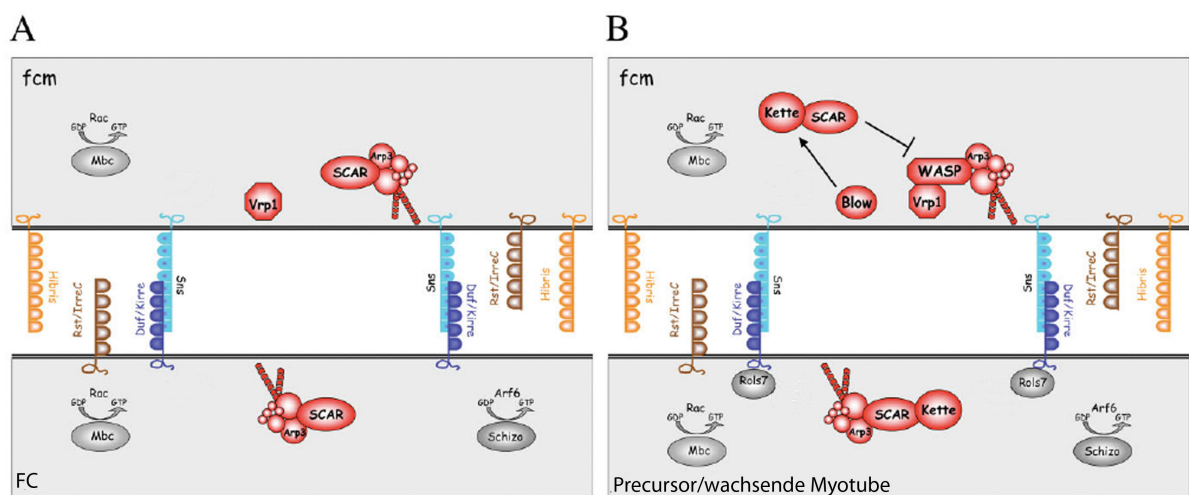


Abbildung 2.2: Modell der zweistufigen Myoblastenfusion. Dargestellt ist der erste (A) und der zweite Fusionschritt (B). Dabei schaffen die Adhäsionsmoleküle Duf und Sns den Kontakt zwischen den Zellen und übermitteln das Fusionsignal ins Zellinnere, wo verschiedene Moleküle die eigentliche Fusion vermitteln. Mehreren Aktinregulatoren wurde bislang eine Rolle in dem Fusionsprozess nachgewiesen, darunter Kette, das genetisch mit Blow interagiert und der Wasp-Vrp1/WIP/Sltr Komplex (in rot, Abbildung verändert nach Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).

2.3 Bei der Myoblastenfusion tritt eine Kontaktstruktur auf, die der immunologischen Synapse im prinzipiellen Aufbau ähnelt

Seit 2007 ist eine Struktur bekannt, die während der Myoblastenfusion an der Kontaktstelle zwischen FCM und Founderzelle auftritt und den Ort der eigentlichen Fusion darstellt. Die Struktur heisst 'Fusion-Restricted Myogenic-Adhesive Structure'

(FuRMAS) und besteht aus einem äußeren Ring von Adhäsionsmolekülen – also Sns auf der Seite der FCMs und Duf und Rst auf der Seite der Founderzelle – und einem Aktin-Pfropf in dessen Innerem. Zu dem Aktin-reichen Zentrum lokalisiert sich das Aktin-interagierende Protein Titin und FCM-stämmig das Protein Blown fuse (Abb. 2.3, Kesper et al., 2007, Übersichtsartikel Önel und Renkawitz-Pohl, 2009). Besonders interessant ist diese Struktur auch deshalb, weil sie mit zunehmendem Fortschreiten der Fusion größer wird. Nachdem das Filopodium des FCMs gerade erst Kontakt zu der Founderzelle geschaffen hat, beträgt der Durchmesser des FuRMAS-Ringes ca. $1\ \mu\text{m}$. In einem späteren Stadium der Fusion erreicht der Ring einen Durchmesser von etwa $5\ \mu\text{m}$ (Kesper et al., 2007). Zur Ausbildung der Ringstruktur ist der Zell-Zell-Kontakt unbedingt notwendig, da *sns*-mutante Embryonen zwar eine Lokalisation von Duf an der Membran zeigen; dieses aber nicht ringförmig angeordnet wird (Kesper et al., 2007). Andererseits ist die Bildung der FuRMAS-Struktur nicht von Blow, Kette, Mbc oder Rols abhängig (Kesper et al., 2007).

Das Modell der FuRMAS ist deshalb so interessant für die Erklärung der Myoblast-fusion, weil es einen stabilen Rahmen aus Adhäsionsmolekülen für die Fusion darstellt, so dass die Fusion kontrolliert und geordnet ablaufen kann. In dieser Theorie müsste die eigentliche Fusionsmaschinerie in dem aktinreichen Zentrum des sich weitenden FuRMAS lokalisieren, wo die Fusionspore entsteht und sich weitet (Kesper et al., 2007; Übersichtsartikel Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).

Vergleichbare Kontaktstrukturen gibt es auch in anderen Systemen. Aus dem Immunsystem kennt man die immunologische Synapse (IS; Übersichtsartikel Friedl und Storim, 2004, Friedl et al., 2005), die zwischen der T-Zelle und der Antigen-präsentierenden Zelle auftritt und die – ähnlich wie die FuRMAS – einen Ring aus Adhäsionsmolekülen sowie ein Aktin-reiches Zentrum besitzen. Von den immunologischen Synapsen existieren verschiedene Konstruktionsprinzipien. Die monozentrische immunologische Synapse (Abb. 2.4) hat einen zentralen aktinreichen Bereich (cSMAC = central supramolecular activation cluster), deren Aufbau durch kleine Rho GTPasen kontrolliert wird und der neben Aktin durch eine hohe Konzentration von T-Zell-Rezeptoren und Protein-Kinase θ gekennzeichnet ist. Der äußere Ring der immunologischen Synapse wird pSMAC (peripheral supramolecular activation cluster) genannt und zeichnet sich besonders durch Integrine, z.B. LFA-1 (lymphocyte-function antigen 1) aus, das während des Aufbaus aus dem zentralen Kern der Kontaktstruktur in den peripheren Ring verlagert wird (Friedl und Storim, 2004). Für diesen Prozess sind Proteine

wie ADAP und Skap-55 sowie Aktin-Reorganisationen notwendig (siehe 2.3.1). Bei immunologischen Synapsen handelt es sich um sehr transiente Strukturen, die nach kurzer Zeit wieder aufgelöst werden. Die Funktion konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden, allerdings scheint eine Verlängerung der Signalgebung oder eine Runterregulierung von T-Zell-Rezeptoren in der späteren Phase des Kontaktes möglich (Übersichtsartikel Friedl und Storim, 2004, Wang und Rudd, 2008).

Weitere Strukturen, die den FuRMAS ähneln, sind Podosomen und Invadopodien, die als Kontakt zwischen einer Zelle und der extrazellulären Matrix einer anderen Zelle aufgebaut werden. Auch hier zeigt sich ein zweigeteilter Aufbau aus aktinreichem Zentrum und integrin-angereicherter Ringstruktur (Linder und Kopp, 2005). Im Gegensatz zu immunologischen Synapsen und FuRMAS wird für Podosomen und Invadopodien auch eine Funktion im Abbau der extrazellulären Matrix und damit in der Zellinvasion vermutet (Übersichtsartikel Linder und Kopp, 2005).

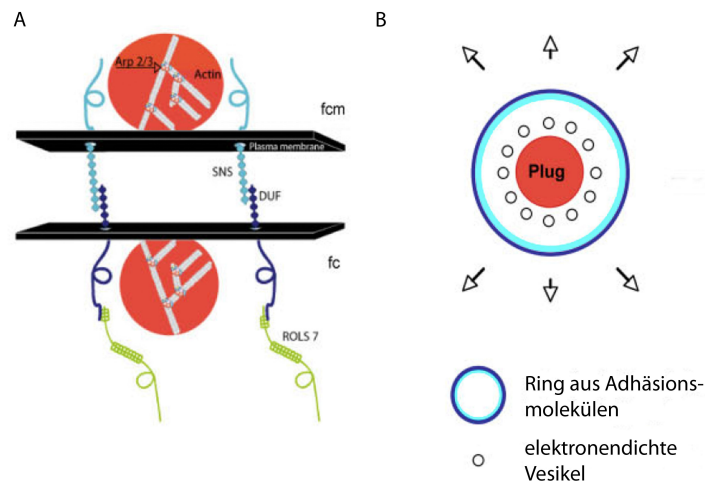


Abbildung 2.3: Modell der FuRMAS-Weitung. In schwarz sind die Plasmamembranen der fusionierenden Zellen dargestellt. Die Adhäsionsmoleküle Sns (hellblau) und Duf (dunkelblau) schaffen den Kontakt zwischen den Zellen und bilden den Adhäsionsring der FuRMAS, der in der Founder-/Precursorzelle durch Rols stabilisiert wird. In der Mitte des Ringes bildet sich ein Aktin-reiches Zentrum (rot) zu dem Blow kolokalisiert. Die FuRMAS Struktur weitet sich mit zunehmender Entwicklung (Kesper et al., 2007, Abbildung verändert nach Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).

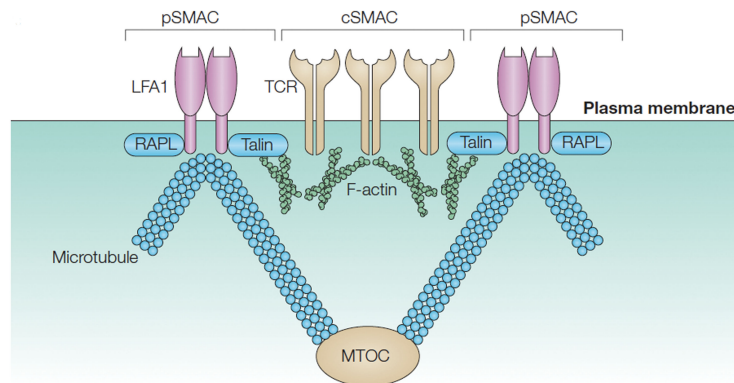


Abbildung 2.4: Aufbau der immunologischen Synapse. Die immunologische Synapse unterteilt sich in das pSMAC (periphere supramolekulare Aktivationscluster) mit Integrinen wie LFA-1 und dem cSMAC (central supramolekulare Aktivationscluster), das Actin-reich ist und den T-Zell-Rezeptor enthält. Intramolekular haben Mikrotubuli Kontakt mit dem pSMACs. Abbildung aus Kinashi, 2005.

2.3.1 Die Proteine Skap-55 und ADAP spielen eine Rolle im Aufbau der immunologischen Synapse

Da in der Dissertation von R.H. Schröter 2006 die Zebrafisch-Proteine Skap-55 und Skap2 als Orthologe des Blown fuse Proteins identifiziert wurden, sind diese Proteine auch von besonderem Interesse für die Forschung an Blow. Da Skap-55 an dem Aufbau der immunologischen Synapse (siehe 2.3) beteiligt ist und Blow im Zentrum der FuRMAS lokalisiert, stellt sich die Frage, ob Blow eine vergleichbare Rolle beim FuRMAS-Aufbau übernehmen kann. Daher kann eine genaue Beleuchtung von der Funktion von Skap-55 und Skap2 lohnend sein:

Wenn eine T-Zelle an eine Antigen-präsentierende Zelle bindet, ist die erste Reaktion der Zelle eine Phosphorylierung verschiedener Proteine, u.a. durch die Fyn-Kinase. Das Protein Skap-55 wurde ursprünglich durch seine Interaktion mit der Fyn-Kinase und der Src-Kinase identifiziert und daher 'Src-associated phosphoprotein of 55 kDa' (Skap-55) genannt (Marie-Cardine, 1998a). Durch einen GST-Pulldown mit der SH2-Domäne von Fyn wurde darüber hinaus noch ein weiteres Protein gefunden, dass Skap-55 in seinen biochemischen Eigenschaften sehr ähnelt und daher Skap-Hom (Skap-Homolog) bzw. Skap-55R (Skap-55-related) oder Skap2 genannt wurde (Marie-Cardine, 1998b). Beide Proteine verfügen über eine PH-Domäne, mehrere Tyrosin-Phosphorylierungsmotive und eine SH3-Domäne am C-Terminus (Übersichtsartikel Wang und Rudd, 2008). Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeiten scheinen die beiden Proteine unterschiedliche Funktionen zu übernehmen, was schon durch die un-

terschiedlichen Expressionsmuster angedeutet wird. Während Skap-55 ausschließlich in T-Lymphozyten exprimiert wird (Marie-Cardine et al., 1998a), wird Skap2 fast ubiquitär in sehr vielen Organen exprimiert, allerdings nur in wenigen hämatopoietischen Zelllinien (Marie-Cardine et al., 1998b).

Beiden Skap-Proteinen ist gemein, dass sie an einen weiteren Interaktionspartner von Fyn binden: ADAP (auch SLAP-130 oder FYB, Marie-Cardine et al., 1998a und 1998b; Übersichtsartikel Simeoni et al., 2004). Skap-55 agiert mit ADAP als funktionelle Einheit und vermittelt das Signal von dem T-Zell-Rezeptor (TCR) zu den Integrinen, was zur Aktivierung und zu einer verstärkten Adhäsion des Integrins LFA-1 führt (Wang et al., 2003; Wang und Rudd, 2008). Diese Signalkette ist insbesondere auch für den Aufbau der SMACs der immunologischen Synapse wichtig. Die Proteine kolokalisieren dabei mit dem Aktin-reichen Zentrum der immunologischen Synapse. Die Aufgabe von Skap2 ist noch nicht geklärt. Togni et al. (2005) haben aufgrund ihrer Analysen mit *skap2*-mutanten Mäusen geschlussfolgert, dass eine Funktion in der B-Zell-Aktivierung wahrscheinlich ist. *skap2*-mutanten Mäuse zeigen eine verminderte Adhäsion von B-Zellen zu Fibronectin und ICAM1, dem Liganden von LFA-1. Auch Skap2 agiert vermutlich in Kooperation mit ADAP. Da der mutante Phänotyp allerdings deutlich schwächer als bei Skap-55 ausfiel, ist es möglich, dass ADAP in B-Zellen neben Skap2 noch weitere Mediatoren hat (Togni et al., 2005).

Nach Wang und Rudd (2008) könnten beide Signalwege von Skap-55 bzw. Skap2 über Rap-Proteine auf die Integrine wirken.

2.4 Das PH-Domänen Protein Blown fuse spielt eine zentrale Rolle in der Myoblastenfusion

1997 veröffentlichten Doberstein et al. die Entdeckung eines Proteins, das für die Myoblastenfusion essentiell zu sein schien. In einem Screen für Mutationen, die die Axonbildung der Motoneuronen stören, wurde ein Gen gefunden, dass eben diesen Defekt einer gestörten Myoblastenfusion zeigt (Van Vactor et al., 1993). Das Gen liegt auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms an Position 43E1-43E3 und wurde *blown fuse* (*blow*) genannt (Doberstein et al., 1997). Der kodierende Bereich des Gens trägt zwei Introns sowie ein weiteres Intron im 5'UTR und kodiert für ein 4593 bp großes Transkript, das zu einem 69,5 kDa Protein führt (FlyBase, Stand Oktober 2009).

blown fuse wird in Stadium 10 in 13 Clustern von mesodermalen Zellen exprimiert.

Ab Stadium 11 lässt sich die Expression in Segmentstreifen der fusionierenden Myoblasten erkennen bis ab dem späten Stadium 13 die Expression schwächer wird. Antikörperfärbungen mit anti-Blow verdeutlichen, dass Blow zunächst im Zytoplasma der Myoblasten exprimiert wird (Doberstein et al., 1997) und nach der Zell-Zell-Adhäsion membrannah vorliegt, wo es dann im Zentrum der FuRMS lokalisiert (Kesper et al., 2007). 2006 wurde gezeigt, dass sich die Expression von Blow auf die FCs beschränkt und nicht etwa - wie zuvor angenommen - in beiden Zelltypen stattfindet (Schröter et al., 2006). Nur wenig Blow Protein konnte in den bereits fusionierten Myotuben detektiert werden (Doberstein et al., 1997). Es gibt zwei Mutanten für *blown fuse*, *blow*¹ und *blow*². *blow*² wurde in dieser Arbeit molekular charakterisiert (siehe Ergebnisse) und stellt eine Nullmutante dar, die weder Transkript noch Protein produziert. *blow*¹ zeigt eine Transkription in wildtypischem Ausmaß und ein reduziertes Proteinniveau. Histologisch unterscheiden sich die Phänotypen der beiden Allele nicht. Beide Mutanten zeigen FCs, die Filopodien zu den Founderzellen ausbilden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Blow für die Zell-Zell-Erkennung und -Adhäsion abkömmlich ist. In Stadium 14 zeigt sich ein Phänotyp, der als 'bunch of grapes' charakterisiert wurde: Mehrere FCs haben Kontakt zu einer Founderzelle, können aber nicht fusionieren. In späteren Stadien sind die FCs durch Macrophagen entfernt worden. Ultrastrukturell lassen sich eine wildtypische Anzahl Präfusionskomplexe erkennen (Doberstein et al., 1997), aber nur in einem einzigen Fall konnte auch ein elektronendichter Plaque beschrieben werden (Estrada et al., 2007). Da vereinzelt Fusionen in *blow*-Mutanten stattfinden können, so dass mehrkernige Precursorzellen entstehen (Doberstein et al., 1997; Schröter et al., 2004; Beckett und Baylies, 2007), ist es auch möglich, dass die sehr limitierte Anzahl von elektronendichten Plaques auf Fusionen im ersten Fusionsschritt zurückzuführen ist (Estrada et al., 2007). In 70 % der untersuchten Embryonen von Beckett und Baylies (2007) zeigen die Embryonen dagegen gar keine Fusion. Die Autoren stellen daher die Hypothese auf, dass *blow*-Mutanten bereits in der ersten zeitlichen Phase des Prozesses stoppen und die vereinzelt auftretenden Fusionen durch unvollständige Penetranz des Phänotyps zu Stande kommen (Beckett und Baylies, 2007).

In Phalloidininfärbungen zeigen *blow*-mutante Embryonen - ähnlich wie *mbc*-, *rac*- und *kette*-mutante Embryonen - vergrößerte Actin-Foci in einer erhöhte Anzahl im Vergleich zu Wildtypembryonen (Richardson et al., 2007).

Durch Analysen von Doppelmutanten und Rettungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Blow genetisch mit dem Aktinregulator Kette interagiert. Da eine Über-

expression von Kette den *blow*²-mutanten Phänotyp partiell rettet, kann geschlossen werden, dass Kette in der Signalkette nach Blow agiert. Damit steht auch Blow in Zusammenhang mit der Aktinreorganisation der Myoblastenfusion (Abb. 2.2, Schröter et al., 2004).

Für die Myoblastenfusion der viszeralen Muskulatur sind weder Blow noch Kette essentiell (Schröter et al., 2006) wie Färbungen an den Mutanten zeigen. Anders als im somatischen Mesoderm ist Blow im viszeralen Mesoderm nicht nur in den FCMs sondern auch in den CVMFs (zirkuläre viszerale Founderzellen) exprimiert. Die unterschiedliche somatische und viszerale Expression wird durch Enhancerelemente im ersten Intron von *blow* koordiniert (Schröter et al., 2006).

Eine Analyse der Aminosäuresequenz von Blow gibt wenig Aufschluss über potentielle Funktionen des Proteins. Als einzige prominente Domäne zeigt der SMART-Algorithmus eine PH-Domäne in den Aminosäuren 205 bis 306 an. Eine aktualisierte *in silico*-Analyse nach weiteren Hinweisen ist Gegenstand dieser Arbeit.

2.4.1 PH-Domänen sind häufig für die Rekrutierung der Proteine an Zellmembranen nötig

Als einzige signifikante Domäne enthält Blow eine PH-Domäne ('Pleckstrin Homology'-Domäne). PH-Domänen sind sehr unterschiedlich in der Zusammensetzung der Aminosäuren und werden häufig in Proteinen mit membranassoziierten Funktionen gefunden, da PH-Domänen an Phosphoinositide binden können (Übersichtsartikel Lemmon, 2008). Dabei handelt es sich um Phosphoinositole, die an Position 3-, 4- oder 5 phosphoryliert sind und in kleiner Menge in Zellmembranen vorkommen. PH-Domänen dienen besonders als Effektoren der Second Messenger PtdIns(3,4,5)P₃ und PtdIns(4,5)P₂. Für die PH-Domänen einzelner Proteine wie der 'Bruton's Tyrosine Kinase' und der Protein Kinase B ist bekannt, dass sie zytoplasmatisch verteilt sind, aber nach Aktivierung durch die Phosphoinositide-3-Kinase zu der Zellmembran lokalisieren.

Alle hochaffinen, stereospezifischen PH-Domänen weisen das Sequenzmotiv KX_n(K/R)-XR in einem siebenstängigen β -Faltblatt auf, wobei die basischen Seitenketten von Lysin und Arginin die meisten Interaktionen mit den Phosphatgruppen der Membranen vermitteln. Andere Seitenketten der PH-Domäne können weitere Interaktionen vermitteln (Übersichtsartikel Lemmon, 2008). Die Blow PH-Domäne verfügt über das Sequenzmotiv; ist aber darüber hinaus noch nicht weiter charakterisiert worden. Es scheint es außerdem denkbar, dass PH-Domänen-Proteine die Lipidzusammenset-

zung der Membran beeinflussen, wie das für das MARCKS-Protein (myristoylated alanine-rich PKC substrate) beschrieben wurde (McLaughlin et al., 2002 und 2005). M. Lemmon stellt in seinem Übersichtsartikel die Hypothese auf, dass PH-Domänen dadurch Funktionen in Membran- und/oder Vesikel-Spaltungen übernehmen können (Lemmon, 2008).

Die Forschung an PH-Domänen weist noch viele offene Fragen auf. Neben der Charakterisierung der Membranbindung weiterer PH-Domänen-Klassen, gibt es viele PH-Domänen Proteine, denen bislang noch keine Bindung an Phosphoinositide nachgewiesen werden konnte. Die Funktion dieser Domänen liegt noch völlig im Dunkeln.

2.4.2 Blows genetischer Interaktionspartner Kette ist in anderen Entwicklungssystemen Teil eines Aktin-Regulationskomplexes

Wie unter 2.2.4 und 2.4 beschrieben, interagieren Blow und Kette genetisch miteinander. Da die Überexpression von Kette *blow*-mutante Embryonen retten kann, agiert Kette nach Blow in der Signaltransduktionskette. Bislang ist diese Erkenntnis die einzige Information, die einen Hinweis auf die Funktion von *blow* gibt.

Kette ist in der Regulation der Arp2/3-Aktivatoren SCAR/WAVE und Wasp beteiligt, wobei Kette in der Myoblastenfusion von *Drosophila* als Antagonist von Wasp und als Aktivator von SCAR/WAVE agiert (Absatz 2.2.4, Richardson et al., 2007; Schäfer et al., 2007).

Die Regulation durch Kette wurde auch in anderen Prozessen als der Myoblastenfusion sowie in anderen Tieren untersucht. Dabei wurde in Säugetieren ein Komplex gefunden, der WAVE-Komplex genannt wurde (Eden et al., 2002; Übersichtsartikel Takenawa und Suetsugu, 2007) und auch für die *Drosophila*-Neurogenese postuliert wurde (Bogdan und Klämbt, 2003). Bei dem WAVE-Komplex handelt es sich um einen zytosolischen Heterokomplex der Proteine Abi (Abelson interactor), NAP1 (dem Homolog von Kette), Sra-1 (auch PIR-121) und HSPC300, der das WAVE-Protein an seiner WHD-Domäne binden und dadurch in einem inaktiven Status hält. Nach der Interaktion mit Nck (dem Homolog des *Drosophila* Proteins Dock) oder einem GTP-gebundenen Rac-Molekül wird das SCAR/WAVE Protein aus dem Komplex entlassen und damit aktiviert (Eden et al., 2002). Dabei ist zu beachten, dass der inhibierende Komplex bislang nicht in der Muskelentwicklung von *Drosophila* nachgewiesen wurde und dass Kette in diesem Prozess als Aktivator und nicht als Repressor von SCAR/WAVE bekannt ist (Richardson et al., 2007).

2.5 Die Tyrosin-Kinase Abelson ist ein Kandidat für eine mögliche Blow-Phosphorylierung

Blow verfügt über einige putative Phosphorylierungsstellen (Dissertation R.H. Schröter, 2006; siehe auch 5.3.2). Dabei scheint eine Phosphorylierung durch die Abelson-Kinase besonders wahrscheinlich, da eine *in silico*-Analyse das Tyrosin 342 als Substratmotiv für diese Kinase vorhersagt.

Bei der Abelson-Kinase handelt es sich um eine zytoplasmatische Kinase, die N-terminal über eine SH2-, eine SH3- und eine Tyrosin-Kinase-Domäne verfügt. In Vertebraten folgt weiter C-terminal eine Sequenz für die Lokalisation im Nukleus, eine Prolin-reiche Region, eine DNA-Bindedomäne, eine Aktinbindedomäne und ein Exportsignal für den Transport aus dem Nukleus (Donaldson et al., 2002; Hernandez et al., 2004).

Die wildtypische Abelson-Kinase liegt in der Zelle zunächst autoinhibiert vor. Dabei findet sich eine intramolekulare Interaktion, bei der der myristoylierte N-Terminus die Kinase-Domäne bindet (Nagar et al., 2003). Das Protein wird z.B. durch DNA-Schäden, fortschreitenden Zell-Zyklus und Zell-Adhäsion aktiviert (Raitano et al., 1997). Abl konnte in Vertebraten ein großes Spektrum an Funktionen zugeordnet werden, u.a. scheint es in Signal-Transduktionen, Regulierungen des Zytoskeletts und des Zellzyklus, der Entwicklung des Nervensystems und der Apoptose-Induktion beteiligt zu sein (Donaldson et al., 2002). Für diese mannigfaltigen Aufgaben braucht Abelson eine große Anzahl an Effektoren. So ist bekannt, dass Enabled (Ena), N-WASP, Crk und p190RhoGAP durch Abelson reguliert werden und die Zytoskelett-Aktivität modulieren (Übersichtsartikel Hernandez et al., 2004; siehe auch 2.6).

In *Drosophila* ist die Forschung an Abelson weniger fortgeschritten. 1992 haben Bennett und Hoffmann die räumliche und zeitliche Expression beschrieben. Eine *in situ*-Hybridisierung hat eine hohe Konzentration maternal bereitgestellter mRNA in Embryonen des Präblastoderms aufgezeigt. Übereinstimmend mit einem Phänotyp in der Axon-Wegführung in *abl*-mutanten Embryonen, wurden in älteren Embryonen eine *abl*-Expression in den Axonen der wachsenden Nervenzellen gefunden. Darüber hinaus ist *abl* in der entstehenden Muskulatur, besonders im viszeralem Mesoderm, sowie in den Imaginalseiben exprimiert. Ab Stadium 17 lässt sich keine *abl*-Expression mehr nachweisen (Bennett und Hoffmann, 1992). In meiner Diplomarbeit (Sickmann, 2005) sowie in der Dissertation von R. H. Schröter (2006) konnte gezeigt werden, dass

abl-mutante Embryonen einen starken Fusionsdefekt in Muskelentwicklung haben. Die Entwicklung des viszeralen Mesoderms scheint allerdings unbeeinträchtigt zu sein (Bachelorarbeit M. v. Rüdén, 2009).

2.6 Crk könnte in der Myoblastenfusion im gleichen Signalweg wie Blow agieren

Bis heute konnte noch nicht geklärt werden, wie das Fusionssignal von dem Adhäsionsmolekül Sns in das Innere der FCMS weitergeleitet wird. Da eine *in silico*-Analyse Grund zur Annahme gab, dass Crk ein Bindungspartner von Blow sein kann, soll auch Crk in dieser Einleitung näher betrachtet werden.

Das Adaptorprotein Crk wurde ursprünglich in Vertebratenzellen gefunden. In Vertebraten existieren zwei verschiedene Crk-Proteine (Crk I und II), die beide N-terminal eine SH2-Domäne besitzen, die von einer (Crk I) oder zwei SH3-Domänen (Crk II) gefolgt wird. Außerdem gibt es ein Crk-ähnliches Protein, CrkL, das ebenfalls eine SH2 und zwei SH3-Domänen hat (Birge et al., 2009). Das *Drosophila* Crk-Protein besitzt eine SH2-Domäne am N-Terminus und zwei SH3-Domänen C-terminal davon. In Vertebratenzellen wurden Bindemotive für die SH-Domänen identifiziert. Demnach binden die SH3-Domänen bevorzugt an P-x-x-P-x-K-Sequenzen und SH2-Domänen an pY-x-x-P-Sequenzen (Übersichtsartikel Feller, 2001). Ein globaler Hefe-2-Hybrid-Screen zeigt eine Interaktion von Blow und Crk auf (Giot et al., 2003) .

Als klassisches Adaptormolekül vermittelt Crk häufig die Antwort zwischen externen Stimuli und nachfolgenden Signalketten. Die SH2-Domäne interagiert dabei meist mit den stromaufwärts gelegenen Partnern der Kaskade während die SH3-Domäne die Verbindung zu den Effektoren herstellt (Übersichtsartikel Feller, 2001). In Vertebraten sind dabei über 40 Crk-Bindepartner beschrieben worden, u.a. das LFA-1-Integrin, das auch beim Aufbau der immunologischen Synapse von Bedeutung ist (siehe 2.3, Petruzzelli et al., 1996; Birge et al., 2009). Diese Vielzahl von Interaktionen impliziert, dass die Aktivität von Crk sehr genau reguliert werden muss, damit die Signalkaskaden z.B. nicht signalunabhängig angeschaltet werden. Ein Regulationsmechanismus von Crk wurde in Feller et al. (1994) postuliert und in mehreren weiteren Arbeiten inzwischen bestätigt (Moarefi et al., 1997; Sicheri et al., 1997; Xu et al., 1997, Donaldson et al., 2002). Dabei phosphoryliert die Abelson-Kinase (siehe 2.5) Crk an Tyrosin 221, an das daraufhin die SH2-Domäne desselben Crk-Proteins binden kann. Die dadurch entstandene intramo-

lekulare Bindung verhindert, dass die SH3-Domäne an andere Proteine binden kann, so dass Crk in inaktiver Form vorliegt. Auch bereits gebildete Bindungen von Crk werden durch die Phosphorylierung an Tyrosin 221 wieder gelöst (Breitner-Johnson and LeRoith, 1995; Okada und Pessin, 1997; Koval et al., 1998; Hashimoto et al., 1998; Nakashima et al., 1999; Escalante et al., 2000; Kain und Klemke, 2001; Übersichtsartikel Feller, 2001). Interessanterweise funktioniert die Interaktion von Abelson und Crk bi-direktional, so dass es neben der Inaktivierung von Crk auch zu einer Aktivierung von Abelson kommt (Birge et al., 2009).

Für Vertebraten sind einige Crk-aktivierte Effektoren bekannt: Kinasen wie die Abelson-Kinase (s. oben) und Mitglieder der Src-Familie sowie GTPasen wie Rac (Donaldson et al., 2002; Feller, 2001). An *Drosophila* ist eine Untersuchung von Crk schwieriger, da Crk auf dem vierten Chromosom liegt, das sehr schlecht charakterisiert ist und für das keine Balancer-Chromosomen existieren. Aber es ist bewiesen, dass das DOCK180-Homolog Mbc mit Crk interagiert. Mbc kann über Rac1 die Aktin-Reorganisation einleiten (Erickson et al., 1997; Galletta et al., 1999). Irritierenderweise wurde in Rettungsexperimenten gezeigt, dass die Bindung von Mbc an Crk nicht für die Funktion von Mbc in der Myoblastenfusion nötig ist (Balagopalan et al., 2006), obwohl eine Rolle von Crk in der Myoblastenfusion zumindest an Zebrafisch klar gezeigt werden konnte (Moore et al., 2007). Hierbei ist zu beachten, dass Mbc in vielen Entwicklungsprozessen von *Drosophila* eine Rolle spielt, so dass die *in vitro* nachgewiesene Interaktion (Galletta et al., 1999) für andere Prozesse von Wichtigkeit sein könnte.

Durch differentielles Spleißen werden in *Drosophila* verschiedene Transkripte hergestellt. Das daraus resultierende Protein CrkS hat eine um 18 Aminosäuren kürzere SH2-Domäne als seine Isoform CrkL.

3 Aufgabenstellung

Das Gen *blown fuse* kodiert für ein PH-Domänen-Protein, das – wie der mutante Phänotyp zeigt – für die Myoblastenfusionen über das Precursorstadium hinaus unbedingt vonnöten ist und nur in den FCMs exprimiert wird (Doberstein et al., 1997, Schröter et al., 2006). Zwar konnte eine partielle Rettung des *blow²*-Phänotyps durch die Expression des Aktinregulators Kette gezeigt werden (Schröter et al., 2004), aber weder die Funktion noch die Regulation des Proteins konnten bislang aufgeklärt werden.

Eine *in silico*-Analyse der Aminosäuresequenz des Proteins hat putative Interaktionen mit verschiedenen Kinasen und Adaptorproteinen, sowie mit dem Tyrosin 342 ein Motiv für eine Phosphorylierung aufgezeigt. Eines der Adaptorproteine ist das Protein Crk, für das eine Interaktion mit Myoblast city bereits gezeigt werden konnte (Erickson et al., 1997). Daher sollte in einem Hefe-2-Hybrid-Versuch geklärt werden, ob Blow mit Crk interagiert, so dass über diesen Weg das Fusionssignal weitergeleitet werden kann.

Da das Tyrosin 342 eine wichtige Rolle in der Regulation des Proteins zu spielen scheint, sollten zwei mutante Konstrukte von Blow in der Fliege exprimiert werden. Dabei stellt Y342H eine Mutation dar, die die Funktion des phosphorylierten Tyrosins verhindert, während Y342D als phosphomimetische Mutation eine potentiell konstitutiv-aktive Form darstellt. Als weitere Blow-Konstrukte sollten Blow-Versionen mit deletierter bzw. isolierter PH-Domäne exprimiert werden, um zu überprüfen, ob die Lokalisation des Proteins von der PH-Domäne abhängig ist. Parallel dazu sollte überprüft werden, ob Blow in verschiedenen Fusionsmutanten noch an den Zellkontakten lokalisiert.

Schließlich sollte *in silico* und durch Expressionsversuche überprüft werden, ob das Zebrafischprotein Skap2 ein Ortholog von Blow ist.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Methoden - Material

4.1.1 Geräte

Digitale Mikroskop Kamera

Elektrophoreseapparaturen

Fotomikroskop

Kryobad

Kühlzentrifuge

Fotometer

PCR-Thermoblock

Schüttler

Vakuum-Heiz-Zentrifuge

Tischzentrifugen

pH-Meter

UV-Transilluminator

CCD-Kamera

Wasserbad

Wärmeschrank

SDS-PAGE Kammern

Digitalkamera

Polaroid DMC1

Werkstatt, Universität Marburg

Axiophot, Zeiss

KH3, Biometra

Heraeus Megafuge 1.0 R

Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech

Personal Cyclor, Biometra

Rocky 3D, Horizontalschüttler

Univapo 100H, Uniequip, Martinsried

Biofuge fresco, Heraeus

Biofuge pico, Heraeus

Ultrspec 3000, Pharmacia, Freiburg

Ultralum, Electronic Dual-Light-Transilluminator

Ultralum, Carson Californien

Haake 5P

Haake C1

Memmert, Schwabach

peqlab, Erlangen

Powershot A 80, Canon

4.1.2 Chemikalien

Acrylamid	Fluka, Buchs
Adenosintriphosphat	Boehringer, Mannheim
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco, Eggenstein
Bacto-Casitone	Becten, Dickensens, Frankreich
Bacto-Trypton	Difco, Eggenstein
Blocking Reagenz	Roche, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (X-Phosphat)	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
DAB	Sigma, Deisendorf
Dan Klorix (Natriumhypochlorid)	Colgate Palmolive, Hamburg
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Diethyether	Roth, Karlsruhe
Digoxigenin	Boehringer, Mannheim
1,4-Dithio-L-threitol (DTT)	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
DMEM (low glucose)	PAA, Pasching
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Fluka, Neu-Ulm
Heptan	Roth, Karlsruhe
Hybond-N-Membran	Amersham, Braunschweig
Isopropanol	Roth, Karlsruhe

Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Levanisol	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisendorf
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
4-Nitrotetrazoiumchlorid (NBT)	Roche, Mannheim
Octyl-Phenol-Polyethylen-Glycolether (Triton X-100)	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Poly-Oxy-Ethylen-Sorbitan-Mono-Laurat (Tween 20)	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Select-Agar	Invitrogen, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetra-Ethyl-Methylendiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Tryphan-Blaulösung	Sigma, Taufkirchen
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Urea	Roth, Karlsruhe
Voltalef-Öl	Lehmann, Voss & Co., Hamburg
Wasserstoffperoxid	Merck, Karlsruhe

Weitere, hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen/Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisendorf) bezogen.

4.1.3 Enzyme und Kits

- **Enzyme**

Alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonucleasen:	Fermentas, St. Leon-Rot bzw. Amersham, Braunschweig
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden bzw. Sigma, Deisendorf
<i>Sp6</i> -RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
<i>T7</i> -RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Hot Star Taq Plus	Qiagen, Hilden
AccuPrime Taq	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
T4-Ligase	Boehringer, Mannheim
Trypsin	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim

- **Fertige Reagenziensätze (Kits)**

Jetstar Plasmid Kit 2.0	Genomed, Bad Oeynhausen
JetSorb	Gel Extraktion Kit /300, Genomed, Bad Oeynhausen
Vectastain ABC Elite Kit PK-6100 Standard	Camon, Wiesbaden
Individual Indirect Tyramide	
Reagent Pack (TSA)	Perkin Elmer Life Sciences, Boston
CytoTrap Vektor Kit	Stratgene, La Jolla, Californien
TNT Quick Coupled Transcription/ Translation System	Promega, Mannheim
RNA-DIG-labeling Mix	Roche, Mannheim
ProFection Mammalian Transfection System	
- Calcium Phosphate	Promega, Mannheim
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Oligotex mRNA Mini Kit (12)	Qiagen, Hilden

4.1.4 Antikörper und Seren

anti-Blow (aus Kaninchen, 1: 200)	D. Buttgerit
anti- β -3-Tubulin (aus Meerschweinchen, 1: 5000)	D. Buttgerit
anti- β -Galaktosidase (Kaninchen, 1 : 5000)	D. Buttgerit
anti-HA (aus Maus, 1 : 200)	Covance, Münster
anti-Maus, biotinyliert (aus Pferd, 1: 500)	Vector Laboratories, Burlingham
anti-Meerschweinchen, biotinyliert (1: 600)	Vector Laboratories, Burlingham
anti-Kaninchen, AP-gekoppelt (1: 600)	Vector Laboratories, Burlingham
anti-Maus, Cy2 (1:200)	Dianova, Hamburg
anti-Maus, Cy3 (1:200)	Dianova, Hamburg
Normales Ziegenserum	Vector Laboratories, Burlingham
Pferdeserum	Vector Laboratories, Burlingham

Die anti-Blow Antikörperfärbungen in den Abbildungen 5.1 und 5.12 wurden von Detelv Buttgerit durchgeführt.

4.1.5 Bakterien- und Hefestämme sowie Plasmide

- Bakterienstämme

DH5 α *supE44, $\Delta lacU169$ ($\Phi 80 lacZ \Delta M15$), *hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1**

- Hefestämme

cdc25H (α) *MAT α ura3-52 his3-200 ade 2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 cdc25-2 Gal⁺*, Stratagene, La Jolla, Californien

- Plasmide

pCR-II-TOPO	Klonierungsvektor für PCR-Produkte, Invitrogen, Karlsruhe
pCR-II-TOPO	
-Blunt	Klonierungsvektor für PCR-Produkte, Invitrogen, Karlsruhe
pUAST	P-Element-Transformationsvektor zur Expression eines spezifischen ORFs

p π 25.7wc	Helferplasmid für die P-Element-Transformation, das die Sequenz für die Transposase enthält
pcDNA3	Säugetier-Expressionsvektor, Invitrogen, Karlsruhe
pMyr	Hefe-Vektor für den Hefe2Hybrid-Versuch ('Beute-Vektor'), Stratagene, La Jolla, Californien
pSos	Hefe-Vektor für den Hefe2Hybrid-Versuch ('Köder-Vektor'), Stratagene, La Jolla, Californien
pSos Col I	Hefe-Kontroll-Vektor für den Hefe2Hybrid-Versuch, Stratagene, La Jolla, Californien
pSos MAFB	Hefe-Kontroll-Vektor für den Hefe2Hybrid-Versuch, Stratagene, La Jolla, Californien
pMyr Lamin C	Hefe-Kontroll-Vektor für den Hefe2Hybrid-Versuch, Stratagene, La Jolla, Californien
pMyr MAFB	Hefe-Kontroll-Vektor für den Hefe2Hybrid-Versuch, Stratagene, La Jolla, Californien
pMyr SB	Hefe-Kontroll-Vektor für den Hefe2Hybrid-Versuch, Stratagene, La Jolla, Californien

Karten der Vektoren befinden sich im Anhang der Diplomarbeit.

4.1.6 Materialien für den Hefe-2-Hybrid-Interaktionstest

nach Angabe des CytoTrap-Vektor-Kits (Stratagene, La Jolla, Californien)

4.1.7 Materialien für SDS-PAGEs

Acrylamid-Stock-Lösung	30%Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid
Temed	Tetraethylenmethyldiamin
10% APS	10%Ammoniumpersulphat
10% SDS	10% Sodiumdodecylsulfat
Sammelgel-Puffer	1 M Tris-HCl pH 6,8
Trenngelpuffer	1 M Tris-HCl, pH 8.8
SDS-PAGE-Probenpuffer	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 3% SDS, 5% DTT, 10% Glycerin, 0,025 % Bromphenolblau
SDS-PAGE-Laufpuffer	0,025 M Tris, 0,19 M Glycin, 0,1% SDS

Färbelösung	0,05% Coomassie-Blau, 40% Methanol, 10% Eisessig
Entfärbelösung	40% Methanol, 10% Eisessig

4.1.8 Nähr- und Zuchtmedien

Medien für *Drosophila melanogaster*

Futter- und Zuchtmedien:

- 90 g Agar Agar
- 1 kg Maismehl
- 180 g Trockenhefe
- 1 kg Malzextrakt
- 230 g Zuckerrübensirup
- 120 ml 20% Nipagin in 70 % Ethanol
- 360 ml 20 % Propionsäure
- ad 12 l in Wasser

Fruchtsaft-Agar für Ablageschalen oder -flaschen:

- 375 ml A. dest
- 13,5 g Agar agar
- 6,25 g Zucker
- 1 g Nipagin
- 125 ml Traubensaft

Medium für *Escherichia coli*

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium):

- 1% Bacto-Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 85,5 mM NaCl

Die Bakterienanzucht erfolgte in flüssigem LB-Medium in Mini- oder Midi-Maßstab. Zur Isolierung einzelner Kolonien bzw. Bakterienstämme wurden feste Agarnährböden verwendet, für die flüssiges LB-Medium mit 1,5 % Agar versetzt wurde.

4.1.9 Fliegenstämme

white ¹¹¹⁸	weißäugiger Fliegenstamm, der als wildtypische Referenz für die Entwicklung des Mesoderms verwendet wird (Rubin und Spradling, 1982)
CSTM	weißäugiger Stamm, der Sp/CyO auf II und MKRS ^{Sb} /TM2 ^{Ubx} auf III trägt
;If/CyO ^{hg} ;	Stamm mit If und blaubalanciertem CyO auf II
::Dr/Sb TDLZ e	Stamm mit Dr und blaubalanciertem Balancer auf III
:: <i>abl</i> ⁴	:: <i>abl</i> ⁴ <i>kar red e</i> / Sb TDLZ e
BL 4918	:: <i>wg</i> -Gal4: Gal4-Treiber hinter <i>wg</i> -Promotor auf III
BL 6018	Defizienz der Gene <i>duf</i> und <i>rst</i>
BL 1617	loss-of-function EMS-Mutante von <i>myoblast city</i> : mbc ^{c1}
<i>arp3</i> ^{schwächling}	hypomorphes Allel von <i>arp3</i> , Berger et al., 2008
<i>kette</i> ^{J4-48}	loss-of-function Allel von <i>kette</i> , Hummel et al., 2000
<i>lmd</i> ^{E202}	EMS-Allel von <i>lmd</i> , noch nicht charakterisiert, Hummel et al., 2000
<i>sns</i> ²⁰⁻²³	loss-of-function Allel von <i>sns</i> , Paululat et al., 1995, charakterisiert in Bour et al., 2000
:: UAS- <i>blowFL</i>	white ¹¹¹⁸ -Stamm mit Insertion von UAS- <i>blowFL</i> auf III C. Stute, unveröffentlicht
:: UAS- <i>blowΔN-113</i>	white ¹¹¹⁸ -Stamm mit Insertion von UAS- <i>blowΔN-113</i> auf III. F. Kurtz, R.H. Schröter, unveröffentlicht
UAS- <i>Y342H</i> ::	white ¹¹¹⁸ -Stamm mit Insertion von UAS- <i>blowFL</i> ^{Y342H} auf I. R.H. Schröter, unveröffentlicht
:: UAS- <i>skap2</i>	white ¹¹¹⁸ -Stamm mit Insertion von UAS- <i>skap2</i> auf III. R.H. Schröter, unveröffentlicht
:: UAS- <i>lacZ</i>	white ¹¹¹⁸ -Stamm mit Insertion <i>UAS-lacZ</i> auf III
:: UAS-GFP	white ¹¹¹⁸ -Stamm mit Insertion von <i>UAS-GFP</i> auf III
:: <i>rols</i> -Gal4	white ¹¹¹⁸ -Stamm mit Gal4-Treiber hinter dem <i>rolling pebbles</i> -Promotor auf III, Stute et al., 2006
<i>twist</i> -Gal4;;	white ¹¹¹⁸ -Stamm mit Gal4-Treiber hinter dem <i>twist</i> -Promotor auf I, zu Verfügung gestellt von A. Michelson, Universität Boston
:: <i>sns4,5</i> -Gal4	white ¹¹¹⁸ -Stamm mit Gal4-Treiber hinter dem <i>sticks and stones</i> -Promotor auf III, Stute et al., 2006

4.1.10 synthetisierte Oligonukleotide (Primer)

CvorSH2	5'-CAT GGA TCC ACG TTT CTG ATA GGA ACA G-3'
CvorSH3I	5'-CAT GGA TCC GCA TTG GGG ATC AGT CTT- TTG-3'
CvorSH3II	5'-CAT GGA TCC CTT CCA TTT CGG GAT CTA G-3'
CNotend	5'-CAT GCG GCC GCA CAA TCA TCG ACA AAT- TCA AC-3'
CNotSH2	5'-CAT GCG GCC GCG CAG TCC ACC ATT G-3'
CNotSH3I	5'-CAT GCG GCC GCT AGA TCC CGA AAT GG-3'

Primer zur Klonierung von Crk-Fragmenten in pSos mittels BamHI und NotI

Blow-FusionPCR-FM	5'-TTG ACC TCT GCA GGG ACA AGT GGC C-3'
Blow-FusionPCR-HA-F2	5'-CTC GAG CTA AGC GTA ATC TGG AAC ATC- GTA TGG GTA CAC CTT CTT GAG AAA GCT-3'
Blow-FusionPCR-R2	5'-GAA TTC ATG AAT CCG AAA CCA ACA ACT- ACC AAG C-3'
Blow-FusionPCR-RM	5'-GTC CCT GCA GAG GTC AAG CGG AGA TGC- TGG TGC TCA TTC-3'
Fabo-FusionPCR-R2	5'-GAATTCATGCTTGCCTCCCCGTCACCC-3'

Primer zur Generierung von *blowFLΔPH* mit Schnittstellen XhoI und EcoRI.

Abi-ATG-fwd	5'-CGG AAT TCT ATG TTG ACC GAA ACC CCC ATG G-3'
Abi-flag-rev	5'-GCT CTA GAT TAC TTA TCA TCA TCA TCC- TTG TAA TCG ACA CAA GGC TCT ACG TAG-3'

Primer für das Gen *abelson interactor* zur Klonierung in pGem-T-Easy.

blow-nurPH-ATG-fwd	5'-GAA TTC ATG ACA AAG TAC GGA CAG CTG CAG-3'
blow-nurPH-Stop-rev	5'-CTC GAG CTA GGC ATA ATC TGG CAC ATC- ATA AGG GTA GCG GAT GGC CGC CTC AAT G-3'

Primer zur Generierung von *blow-PH* mit Schnittstellen für XhoI und EcoRI.

1st-fwd-blow-genom	5'-GCC GGA AAG TCG CGC TCG CTT-3'
1st-rev-blow-genom	5'-ACT CCG CCG CGC GCT CCT TG-3'
2nd-fwd-blow-genom	5'-TCG GTT CTG CTG TGC ATG TG-3'
2nd-rev-blow-genom	5'-CTT ATA CTA TTA ACA CCC AAG ACC-3'
3rd-fwd-blow-genom	5'-CGC CCA AGA AAG CTA CTC TG-3'
3rd-rev-blow-genom	5'-GTA TAC TTT AGC ATG GTT TAT TTG-3'
4th-fwd-blow-genom	5'-TGT ACC TGT ACC TCT CTA ATG C-3'
4th-rev-blow-genom	5'-CCT CTC CGA AGT GTT CAA TCT-3'
5th-fwd-blow-genom	5'-GAT GCT GTG CTA TGC CGA CG-3'
5th-rev-blow-genom	5'-GGC ATT TGG GCA CAT CGT ACT C-3'
6th-fwd-bow-genom	5'-CAT GGT GCT CCC TAA GCT GC-3'
6th-rev-blow-genom	5'-ACC AGT TTC GTG CCA GCT TG-3'
7th-fwd-blow-genom	5'-CAC CTC ACC GCA ATC CAG TC-3'
7th-rev-blow-genom	5'-GTG AAT AGC AGA TGA CGG ATG TG-3'

Primer zur Sequenzierung von *blow*².

blow2ndintronVorn	5'-GTCCGCGCCCACTTCCGAGCC-3'
-------------------	-----------------------------

Im Ergebnisteil auch Primer A genannt (5.11).

Primer der RT-PCRs an Embryonen mRNA. Primer B entspricht dem 4th-rev-blow-genom-Primer und Primer C entspricht dem 3rd-fwd-blow-genom-Primer (s.o.).

blow-Y342D-fwd	5'-CCT ACA CAG CAG CGG ACA TCA TAG ACG- AGG AGC CC-3'
blow-Y342D-rev	5'-GGG CTC CTC GTC ATG ATG TCC GCT GCT- GTG TAG G-3'

Primer zu Einfügung der phosphomimetischen Mutation. Zur Klonierung des Konstrukts wurden anschließend die Primer Blow-FusionPCR-R2 und Blow-FusionPCR-HA-F2 mit den Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* verwendet.

Die Oligonucleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

4.1.11 Puffer und Lösungen für Plasmidpräparationen

Puffer und Lösungen für Plasmidpräparationen und Extraktion genomischer DNA

- **Plasmid-Präparation im Mini-Maßstab (analytischer Maßstab)**

S1-Lösung 50 mM Tris/HCl pH 8,0
 10 mM EDTA
 100 µg/ml RNaseA

S2-Lösung 200 mM NaOH
 1%(w/v) SDS

S3-Lösung 2,6 M Kaliumacetat, pH 5,2 (mit Essigsäure eingestellt)

- **Plasmid-Präparation im Midi-Maßstab (präparativer Maßstab)**
(Genomed, Bad Oeynhausen)

E1-Puffer 50 mM Tris/HCl pH 8,0
 10 mM EDTA
 100 µg/ml RNase A

E2-Puffer 200 mM NaOH
 1% (w/v) SDS

E3-Puffer 3,2 M Kaliumacetat, pH 5,5

E4-Puffer 100 mM NaAc
 600 mM NaCl
 0,15% Triton X-100
 pH 5,0

E5-Puffer 800 mM NaCl
 100 mM NaAc
 pH 5,0

E6-Puffer 1250 mM NaCl
 100 mM Tris pH8,5

4.1.12 Puffer und Lösungen für Antikörper-Färbungen

10x PBS (Phosphatpuffer) 130mM NaCl
 7 mM Na₂HPO₄
 3 mM NaH₂PO₄

TNX 7 g NaCl
 200 µl Triton X-100
 ad 1 l aqua dest.

Klorix Haushaltsreiniger

PBT 1x PBS + 0,1% Tween 20

F-PBS-Fixierer 40 g/l Formaldehyd in 1x PBS

DIG3 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl₂, pH 9,5

4.1.13 Puffer und Lösungen für *in situ* Hybridisierungen

Hybridisierungslösung (HS-Lösung) 125 ml Formamid
 62,5 ml 20x SSC
 0,25 ml Heparin (50 mg/ml)
 0,25 ml Tween 20
 ad 250 ml dest Wasser

SSC (20x) 3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat
 sollte pH von 7,0 haben

DIG1 (10x) 1 M Tris/HCl
 1,5 M NaCl
 pH auf 7,0 einstellen

DIG2 1x DIG1
 0,5 % Blockingreagenz
 bei 60 °C lösen

DIG3 0,1 M Tris/HCl
 0,1 M NaCl
 0,05 MgCl₂
 auf pH 9,5 einstellen

4.1.14 Puffer und Lösungen für Zellkultur

Wachstumsmedium 2 mM L-Glutamin
 10 % (w/v) fötales bovines Serum in DMEM (low glucose)

Waschmedium 2 mM L-Glutamin in DMEM (low glucose)

Fixierlösung PBS
 3 % Formaldehyd
 2 % Saccharose

Waschpuffer I PBS
 0,1 M Glycin

Waschpuffer II PBS
 0,2 % Triton
 0,2 % BSA

Blockingpuffer	PBS 2 % Normales Ziegen Serum 0,4 % Triton
Verdünnungspuffer für den ersten Antikörper	PBS 0,1 % Triton

4.1.15 sonstige Puffer und Lösungen

50x TAE-Puffer	242 g Tris 800 ml Wasser 57,1 ml Eisessig (nun auf pH 7,7 einstellen) 18,6 g EDTA ad 1 l mit Wasser auffüllen
10x TBE-Puffer	108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml EDTA (0,5 mol/l, pH 8,0)
Squi B	10 mM Tris pH8,2 1 mM EDTA 25 mM NaCl
Injektionspuffer	0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, pH7,4 5 mM KCl

4.1.16 Computer Software sowie Internet-Seiten

ApE - A plasmid Editor v1.12	DNA-Analyseprogramm
EnzymeX 3	Programm zum <i>in silico</i> Verdau von DNA-Sequenzen
Oligo Calc	Programm zur <i>in silico</i> Analyse von Primersequenzen

Sequence Analysis	Alignmentprogramm
ClustalW2	Alignmentprogramm
CLC Sequence Viewer 6.0.2	Alignmentprogramm
ELM-Server	Programm zur Analyse von Proteinsequenzen
Scansite	Programm zur Analyse von Proteinsequenzen
SMART-Server	Programm zur Analyse von Proteinsequenzen
NetPhos 2.0	Programm zur Analyse von Proteinsequenzen
BLAST	Programm zur Suche von homologen Genen/Proteinen
PubMed	Programm zur Literaturrecherche
Adobe Photoshop CS2 9.0.2	Bildbearbeitungsprogramm
Flybase	Internetdatenbank zu <i>Drosophila</i>
Ensembl	Genom-Datenbank von Mensch, Maus und Zebrafisch
ExPASy	Proteomics Server
BioGRID	Datenbank für Protein-Protein-Interaktionen
BDGP <i>in situ</i> Project	Sammlung von <i>in situ</i> Bildern verschiedener <i>Drosophila</i> Gene

4.2 Material und Methoden - Fliegenhaltung

4.2.1 Stammhaltung von *Drosophila melanogaster*

Die *Drosophila*-Stämme werden in transparenten Plastikflaschen mit Futter- und Zuchtmedium bei 18 °C oder 25 °C sowie bei 70% Luftfeuchtigkeit gehalten. Als (zusätzliche) Nahrung und Eiablage-Stimulanz dient Trockenhefe, die auf das Medium gestreut wird. Sofern die Fliegen nur als Stamm gehalten werden sollen, reicht es aus, sie alle drei Wochen auf neue Flaschen umzusetzen; sollen die Fliegen dagegen vermehrt werden, muss die Frequenz des Umsetzens erhöht werden.

4.2.2 Sammlung von *Drosophila melanogaster*-Embryonen

Wenn *Drosophila melanogaster*-Embryonen zu Analyse-Zwecken gewonnen werden sollen, wird statt dem Zuchtmedium ein Fruchtsaftagar verwendet. Zur Stimulierung der Eiablage bzw. als Nahrung der Fliegen wird dann Trockenhefe auf den Agar gestreut.

Die Fliegen werden bei 25°C gehalten und morgens und abends auf neue Fruchtsaftflaschen gesetzt. Die Embryonen auf den alten Flaschen werden gegebenenfalls bei 18°C gelagert bis sie sich zum gewünschten Stadium entwickelt haben.

4.2.3 P-Element Keimbahntransformationen von *Drosophila*-Embryonen

(Rubin und Spradling, 1982)

Für die Herstellung transgener *Drosophila*-Linien wird das Prinzip der P-Element-Transformation genutzt. Dabei werden die gewünschten P-Element-Plasmide in die Keimzellen von *white⁻* Embryonen eingebracht. Da die injizierten Plasmide stets das *white⁺* Allel tragen, können Fliegen, die das P-Element inseriert haben ab der zweiten Generation an ihrer rot-orangen Augenfarbe erkannt werden.

Bevor den sehr jungen Embryonen durch Injektion ein P-Element in die Keimzellen inseriert werden kann, müssen die Embryonen mit TNX gewaschen und dechorionisiert werden. Anschließend werden die Embryonen in einer Reihe ausgerichtet und mit Hilfe eines Heptanklebers auf einem Deckgläschen aufgeklebt. Anschließend werden die Embryonen in einem Exikator leicht angetrocknet, damit der Innendruck der folgenden Injektion verringert wird. Mit einer Kapillarnadel werden den Embryonen der Injektionsansatz, bestehend aus Injektionspuffer, Plasmid mit gewünschter DNA und Transposase-tragendem Helferplasmid p π 25.7wc, injiziert. Dabei werden nur Embryonen die das Stadium 4 noch nicht erreicht haben, injiziert, da nur bei diesen Tieren transgene Keimzellen durch die Injektion hervorgehen können. Ältere Tiere werden durch seitliches Aufreissen mit der Injektionsnadel getötet. Anschließend werden die Embryonen mit Voltalef-Öl überschichtet, um ein Austrocknen zu vermeiden.

gereinigte DNA	5 μ g
p π 25.7wc	2,5 μ g
10x Injektionspuffer	2,5 μ l
	ad 25 μ l H ₂ O

4.2.4 Etablierung transgener Fliegenlinien

Nach der Injektion sollten einige der injizierten Embryonen die in pUAST enthaltene DNA in das Genom der Keimzellen inseriert haben. Die sich entwickelnden Larven wer-

den von dem Deckgläschen abgesammelt und die daraus schlüpfenden Fliegen werden gegen *white*⁻ Fliegen gekreuzt, so dass in der G1 Generation erstmals orange-rot-äugige Fliegen sichtbar werden sollten. Unter den rotäugigen Fliegen können sowohl Zwillingsschwestern mit dem gleichen Integrationsort als auch Fliegen mit unterschiedlichem Integrationsort sein. Zwei weitere Kreuzungsschritte gegen *white*⁻-Fliegen vermindern das Risiko von Mehrfachinsertionen durch Entkopplung und ggf. Rekombination. Die Nachkommen dieser Kreuzungen können dann durch Kreuzungen mit markierten Fliegen auf den Integrationsort des P-Elements untersucht werden.

4.3 Material und Methoden - histologische Methoden

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden mehrere Antikörperfärbungen durchgeführt. Zwar haben sich die Färbungen durch die Verwendung verschiedener Fliegen und Antikörper sowie in den Antikörperkonzentrationen unterschieden, aber der prinzipielle Ablauf der Färbung war stets der gleiche:

4.3.1 Fixierung der *Drosophila melanogaster*-Embryonen

Für die immunhistologischen Untersuchungen von *Drosophila melanogaster*-Embryonen müssen die Tiere fixiert vorliegen. Dazu werden die Embryonen mit TNX vom Apfelsaftagar gespült und gewaschen. Eine 1:2 Mischung von Klorix zu Wasser entfernt das Chorion in wenigen Minuten. Es folgt nach weiteren gründlichen Waschschritten mit TNX ein 15 minütiges Schütteln in einer Heptan/F-PBS-Mischung (1:2) sowie ein Waschschriff in Heptan mit anschließender Devitellinisierung durch ein Heptan-Methanol-Gemisch (1:2), bei der das Methanol die Vitellinmembran zum Platzen bringt. Nach der Fixierung mit anschließendem Waschen der Embryonen in Methanol sind die Embryonen auch für eine mehrwöchige Lagerung bei 4 °C geeignet.

Da einige Antikörper, wie z.B. der anti-Blow-Antikörper nicht an Formaldehydfixierten Embryonen färben, wurde für diese Färbungen eine alternative Fixierungsmethode angewandt. Dabei werden die Embryonen statt in Heptan/Formaldehyd gespült zu werden, für 20 Sekunden aufgekocht. Das weitere Protokoll unterscheidet sich bei dieser Fixierungsmethode nicht.

4.3.2 Immunhistologie an *Drosophila melanogaster*-Embryonen

Die fixierten und in Methanol gelagerten Embryonen müssen vor Beginn der Antikörperfärbung mehrmals mit PBT gewaschen werden. Danach inkubiert der Erstantikörper über Nacht bei 4 °C unter Schütteln auf den Embryonen. Der zweite Antikörper wird zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen an *white*⁻-Embryonen abgesättigt. Zeitgleich werden die Embryonen vom 1. Antikörper befreit und mehrmals in PBT gewaschen. Anschließend werden sie für 30 Minuten in Serum aus dem Tier, in dem der zweite Antikörper generiert wurde, geblockt. Es folgt die Inkubation mit der Zweit-Antikörperlösung für 2 Stunden bei gemäßigter Bewegung und Raumtemperatur.

Nach der Inkubation folgen erneut weitere Waschschrte in PBT und schließlich die eigentliche Färbung. Dabei gibt es verschiedene Detektionssysteme je nach Zweitantikörper. Ist der Zweitantikörper biotinyliert, erfolgt – meist nach Verwendung des ABC- und TSA-Kits nach Herstelleranleitung – eine Färbung mit DAB und H₂O₂ (10 µl DAB + 5 µl H₂O₂). Ein Antikörper, der an alkalische Phosphatase gekoppelt ist, wird durch eine Färbung mit NBT und X-Phosphat im Dunkeln sichtbar gemacht (3,5 µl NBT + 3,5 µl X-Phosphat). Die Färbungen werden durch mehrmaliges Waschen in PBT gestoppt. Sind die Zweitantikörper Fluoreszenz-gekoppelt, ist keinerlei weiteres Detektionssystem erforderlich.

Die Färbungen werden in Epon oder Fluoromount eingebettet.

4.3.3 Whole-mount *in situ*-Hybridisierung mit RNA-Sonden

Herstellung der Sonden

Zur Herstellung einer RNA-Sonde müssen zunächst 5 µg des Plasmids, das die DNA der gewünschten Sonde enthält, mittels eines Restriktionsverdaus linearisiert werden. Im Anschluss daran wird das linearisierte Plasmid mittels einer Ethanol-Fällung gereinigt. Die gereinigte DNA kann dann zur Transkription der Sonde verwendet werden. Die Synthese und DIG-Markierung der Sonde findet mittels des Roche RNA-labeling Mix statt (Anwendung nach Anleitung). Diese Reaktion findet für zwei bis drei Stunden bei 37°C statt. Nach einer weiteren Ethanol-Fällung sollte im Reaktionsgefäß ein Pellet sichtbar werden, das die Sonde repräsentiert.

Sonden-Spot-Test

Nach der Transkription der Sonde, kann diese im sogenannten Sonden-Spot-Test auf Funktionalität überprüft werden. Dabei werden eine 1:10, 1:100, 1:1000 Verdünnung der Sonde hergestellt und auf eine Hybond- Membran aufgetropft. In einem UV-Crosslinker werden die Sondenproben auf der Membran fixiert. Die so behandelte Membran wird kurz in Puffer DIG1 äquilibriert und anschließend für 5 Minuten in DIG2 gewaschen. Anschließend inkubiert der anti-DIG Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung (in DIG1) auf der Membran. Nach zwei fünfminütigen Waschschritten mit DIG1 wird die Färbung gestartet. Dazu werden 3 ml DIG3 mit 10 μ l NBT und 10 μ l X-Phosphat auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation im Dunkeln für etwa 10 Minuten wird die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt. Durch eine Färbung der Tropfen auf der Membran sollte zu sehen sein, ob die Transkription und Markierung der Sonde funktioniert hat.

***in situ* Hybridisierung**

Vor dem eigentlichen Hybridisierungsschritt werden die Embryonen einmal kurz und einmal für 30 Minuten in PBT gewaschen. Anschließend folgen einige weitere Waschschrritte zur Vorbereitung auf die Hybridisierung: Zunächst ein Schritt für 10 Minuten in PBS/HS (1:2), danach ein weiterer zehnminütiger Schritt in HS-Lösung und ein einstündiger in HS-Lösung auf Hybridisierungstemperatur (50-55°C). Nach diesen Waschschrritten wird die zuvor für 15 Minuten aufgekochte Sonde in gewünschter Verdünnung auf die Embryonen gegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 50-55 °C. Am nächsten Morgen werden die Sonden von den Embryonen genommen und die Embryonen werden viermal für 20 Minuten in HS-Lösung gewaschen. Es folgt ein Waschschrritt für 20 Minuten in PBT/HS-Lösung (1:2) sowie fünf weitere Waschschrritte in PBT. Anschließend kann der präadsorbierte anti-DIG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 auf die Embryonen gegeben werden und für ein bis zwei Stunden inkubiert werden. Es folgen drei weitere Waschschrritte für 10 Minuten in PBT sowie für 10 Minuten in DIG3/Tween 20. Im Anschluss daran kann die Färbereaktion gestartet werden; dafür werden die Embryonen in ein Blockschälchen überführt und mit 1 ml PBT, 3,5 μ l NBT und 3,5 μ l X-Phosphat versetzt. Die Reaktion läuft im Dunkeln ab und kann durch mehrmaliges Waschen mit PBT abgestoppt werden. Nach einer Dehydrierung der Embryonen können diese in Epon eingebettet werden.

4.4 Material und Methoden - Zellkultur

4.4.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zellkultur findet bei 37 °C und 5 % Luftfeuchtigkeit statt. Sobald die Zellen ein Konfluenz von 90 % erreicht haben werden die Zellen gesplittet, d.h. von der Unterfläche gelöst und in niedrigerer Konzentration neu ausgesäht. Dazu wird zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Durch Trypsin werden die Zellen vom Boden gelöst. Es werden 2 bis 5 ml Zellkulturmedium zugegeben und zusammen mit den Zellen mehrmals auf- und abpipettiert. Dann wird die Zellsuspension in ein Falcon-Reaktionsgefäß überführt, das für 1 Minute bei 1000 UpM und 37 °C zentrifugiert wird. Das Pellet wird anschließend in einer kleinen Menge Medium gelöst und in ein neues Zellkulturgefäß überführt. Die genaue Menge des zugesetzten Mediums richtet sich dabei nach der Flaschengröße (kleine Zellkulturflasche ca. 5 ml; große Flasche ca. 25 ml).

4.4.2 Das Aussähen von eingefrorenen Zellen

Wenn Zellen erstmalig aus einem in Flüssigstickstoff gelagerten Stock ausgesäht werden sollen, dann werden die Zellen zunächst im 37 °C Wasserbad aufgetaut und anschließend in eine kleine Zellkulturflasche vorgelegt. Sofort danach werden 5 ml vorgewärmtes Medium hinzugegeben. Am nächsten Tag sollten die Zellen am Boden der Kulturflasche festgewachsen sein, so dass man das alte Medium absaugen und die Zellen mit neuem Medium überschichten kann.

4.4.3 Die Transfektion von Zellen

Bevor die Zellen transfiziert werden können, muß die Zellzahl bestimmt werden. Dazu werden 90 µl Tryphan-Blau mit 10 µl der Zellsuspension vermischt. 10 µl dieser Mischung werden in eine Helber-Zählkammer eingesetzt, so dass die Zellzahl bestimmt werden kann.

5 x 10⁴ Zellen werden in den wells einer 24-Well-Platte ausgesäht und mit Medium überschichtet. Wenn die Zellen am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 70-80 % erreicht haben, können sie transfiziert werden. Dazu werden 1 µg DNA in einem Volu-

men von 22,5 μl mit 2,5 μl CaCl_2 gemischt und tropfenweise zu 25 ml 2x HBS gegeben. Dieser Transfektionsansatz wird tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 16 bis 20 Stunden werden die Zellen zweimal mit Waschmedium gewaschen und schließlich mit Wachstumsmedium überschichtet.

4.4.4 Antigen Nachweis an Zellen

Für den Antigennachweis in Zellen wurden die Zellen in einer Mikrotiterplatte auf runden Deckgläsern ausgesäht. Die Zellen werden zuerst mit PBS auf Raumtemperatur gewaschen. Anschließend werden die Zellen für 10 Minuten in Fixierlösung fixiert, um dann für 5 Minuten in Waschpuffer I gewaschen zu werden. Es folgt ein Schritt mit Blockingpuffer für 15 bis 20 Minuten. Der Blockingpuffer wird dann drei mal für 5 Minuten mit Waschpuffer II abgewaschen. Anschließend folgt die Inkubation mit dem entsprechend verdünnten Erstantikörper auf Parafilm. Dazu werden die Zellen auf den Deckgläschen aus der Mikrotiterplatte herausgenommen und in eine feuchte Kammer auf Parafilm überführt. Auf dem Parafilm wurden Tropfen (ca. 30 μl) mit verdünntem Erstantikörper plziert. Dabei muss beachtet werden, dass die Seite des Deckgläschens auf der die Zellen gewachsen sind, unten liegt; also auf der Flüssigkeit aufliegt. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgt über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Morgen wird der Erstantikörper drei mal für 5 Minuten mit Waschpuffer II abgewaschen und der Fluoreszenz-gebundene, zweite Antikörper für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Drei weitere, fünfminütige Waschschrirte mit Waschpuffer II entfernen den Antikörper und die Zellen können nun entweder direkt in Fluoromount eingebettet werden oder eine Aktinfärbung oder Kernfärbung durchlaufen. Die Aktinfärbung findet mittels Phalloidin statt (50 μl Phalloidin I + 950 μl TRITC für 10 Minuten bei Raumtemperatur) während die Kernfärbung durch Hoechst-Medium geschieht (5 μl Hoechst + 995 μl PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur). Nach beiden Färbungen muss dreimal für 5 Minuten mit Waschpuffer II gewaschen werden.

4.5 Material und Methoden - molekulare Methoden

4.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(Saiki et al., 1988)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur Amplifikation definierter DNA-Stücke. Dazu sind kleine Oligonukleotide (Primer) nötig, die das gewünschte DNA-Stück flankieren. Nach einer Denaturierung bei 94 °C können diese Primer auf der einzelsträngigen Matrize an den Flanken der gewünschten Region binden. Eine Polymerase verlängert die Oligonucleotide. Das durch die Primer definierte DNA-Stück vermehrt sich dadurch in ca. 30-35 Zyklen exponentiell.

Ansatz:

100 ng	cDNA als Matrize
1 µl	forward-Primer (25 pmol/µl)
	- je nach gewünschtem Fragment verschieden
1 µl	reverse-Primer (25 pmol/µl)
	- je nach gewünschtem Fragment verschieden
10 µl	Enhancer-solution
5 µl	10x PCR-Puffer
0,2 U	Taq-Polymerase
ad 49 µl	doppeltdestilliertes Wasser
1 µl	dNTPs (25 µM)

Programm:

5' 94 °C	erste Denaturierung
1' 94 °C	Denaturierung
1' x °C	Binden der Primer an einzelsträngige Matrizen-DNA (Temperatur hängt von Länge und GC-Gehalt der Oligonukleotide ab)
x' 72 °C	Verlängerung der Oligonucleotide durch die Polymerase (Dauer hängt von Länge des gewünschten Fragments ab)

(die letzten drei Schritte werden 30-35 mal wiederholt)

10' 72 °C	Beenden der Polymerisierung aller noch unvollendeten Fragmente
∞ 4 °C	Lagerung

4.5.2 Single Embryo PCR an mutanten Embryonen

Die mit anti- β -3-Tubulin und anti- β -Galaktosidase Antikörper gefärbten *blow*²-mutanten Embryonen werden in PBT rehydriert. In einem Blockschälchen werden die Embryonen, die keine Balancerfärbung, aber den mutanten Phänotyp zeigen, aussortiert und mit einer Präpariernadel einzeln in PCR-Gefäße mit 10-20 μ l SquiB überführt. In das PCR-Gefäß werden 10 ng Proteinase K pipettiert und die Embryonen werden mit der Proteinase K für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Proteinase K durch eine zehnminütige Inkubation bei 85 °C denaturiert. Schließlich werden die Reaktionsgefäße auf Eis gelagert und der PCR-Ansatz auf die Embryonen pipettiert.

4.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ist die Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe möglich. Dabei wandert die negativ geladene DNA im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Das 1-2 %ige Agarosegel enthält 1 μ l Ethidium-Bromid pro 100 ml. Ethidium-Bromid interkaliert in DNA und leuchtet unter UV-Licht, so dass die DNA sichtbar gemacht wird. Ein Marker mit DNA-Stücken definierter Größe wird zeitgleich mit den DNA-Proben auf das Gel aufgetragen, so dass sich die Größen der PCR-Fragmente abschätzen lassen.

4.5.4 Klonieren mit dem TOPOTM-TA-Vektor-Kit

(nach Angaben des Herstellers Invitrogen)

Fragmente aus PCR-Reaktionen werden häufig mittels des TopoTM-TA-Cloning-Kits (Invitrogen) in den pCRII-Topo-Vektor ligiert und in kompetente Zellen (*E. coli* DH5 α) transformiert. Die Fragmente in dem pCRII-Topo-Vektor dienen als sogenannte Vorklone, die für weitere Ligationen benutzt werden. Der pCRII-Topo-Vektor

enthält an seinem 3'-Ende einen Thymin-Überhang, der komplementär zu den Adenin-Überhängen vieler PCR-Produkte ist. Zudem besitzt der Topo-Vektor die Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus an den Thymin-Überhängen gebunden. Diese beiden Eigenschaften ermöglichen ein schnelles Klonieren der PCR-Produkte.

Dabei wird nach folgendem Protokoll vorgegangen: 0,5 – 2 μl PCR-Produkt und 0,5 μl TopoTM-Vektor werden zusammengegeben und mit doppeltdestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 5 μl gebracht. Dieser Ansatz inkubiert für 5 Minuten bei Raumtemperatur und wird anschließend direkt auf die aufgetauten kompetenten Zellen (DH5 α , *Escherichia coli*) gegeben. Der Klonierungsansatz mit den Zellen wird für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 30 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad einer Hitzeschock-Behandlung unterzogen. Sofort danach inkubiert der Ansatz für 5 Minuten auf Eis bevor 250 μl LB-Medium zugegeben werden. Dieser Transformationsansatz wird für 45 Minuten bei 37 °C geschüttelt und anschließend auf zwei LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen. Am nächsten Morgen können Kolonien von den Platten gepickt werden.

4.5.5 Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab und Restriktionsverdau

(Birnboim und Doly, 1979)

Um festzustellen, ob eine Kolonie den Vektor mit gewünschtem Fragment (Insert) enthält, ist es notwendig, die DNA mit Hilfe eines Restriktionsverdaus zu überprüfen. Dazu muss die DNA zunächst aus den Bakterien präpariert werden:

Von den Kolonien der Transformation werden Übernachtskulturen (3 ml LB-Medium mit 3 μl Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt) angeimpft, aus denen die DNA präpariert wird. Dazu werden 1,5 ml der Übernachtskultur in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 13 000 rpm 5 Sekunden lang zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100 μl Puffer S1 resuspendiert. Anschließend wird eine alkalische Lyse mittels Puffer S2 herbeigeführt (5 Minuten Inkubation mit 200 μl Puffer S2 bei Raumtemperatur), die durch 150 μl Puffer S3 neutralisiert wird. Dabei fallen die Proteine als weißlicher Niederschlag aus. Ein Zentrifugationsschritt (5 Minuten, 13 000 rpm) trennt die Proteine von dem Plasmid-enthaltenden Überstand, so dass 400 μl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt werden können. Mit diesem Überstand wird eine Isopropanol-Fällung durchgeführt. Schließlich können die Plasmide in 40 μl Wasser

aufgenommen werden.

Zur Überprüfung, ob die Plasmidpräparation den richtigen Vektor mit der gewünschten DNA enthält, werden 5 μ l der Probe mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut (Ansatz: 5 μ l Plasmid-DNA, 2 μ l Puffer, 0,5 U je Enzym in 20 μ l doppeldestilliertem Wasser. Inkubation für zwei Stunden auf 37 °C). Auf einem Agarosegel sollte sich dann eine Bande korrekter Größe detektieren lassen. Dass es sich um das richtige Fragment handelt, wird mit Hilfe einer Sequenzierung bewiesen (AGOWA, Berlin).

4.5.6 Plasmid-Präparation im präparativen Maßstab

(nach Angaben des Herstellers Genomed, Bad Oeynhausen)

Wenn größere DNA-Mengen oder eine besonders große Reinheit der DNA erforderlich ist, kann eine Plasmid-Präparation im präparativen Midi-Maßstab erfolgen. Dazu muss eine Übernachtskultur in größerem Maßstab (50 ml LB-Medium mit 0,1% Ampicillin (100 μ g/ml)) angeimpft werden. Mit dieser wird eine Plasmidpräparation mit Hilfe des JETstar Plasmid Midi-Kits 5.0 (Genomed, Bad Oeynhausen; Durchführung nach Vorschrift) durchgeführt.

4.5.7 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung einer DNA-Lösung erfolgt mittels photometrischer Bestimmung bei 260 nm. Dabei gilt: $OD_{260\text{ nm}} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{DNA in } \mu\text{g/ml}$ (bei doppelsträngiger DNA und einer Küvettendichte von 1 cm).

Alternativ kann eine DNA-Probe neben einen DNA-Standard auf ein Agarosegel aufgetragen werden, so dass sich die DNA-Konzentration an Dicke und Intensität der Bande abschätzen lässt.

4.5.8 Restriktionsverdau

Restriktionsverdaue von DNA-Fragmenten werden mit 0,5 U pro Enzym und den Puffern des Herstellers durchgeführt. Wenn die DNA nach dem Restriktionsverdau in einer Ligation weiterverwendet werden soll, setzt man 8 μ g DNA als Ausgangsmaterial ein. Bei den Verdauen von Vorklon und Zielvektor müssen dann die selben Enzyme verwendet werden, um ein späteres Ligieren zu ermöglichen.

4.5.9 Elution der DNA aus dem Gel

Die Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen wurde mit Hilfe des JetSorb-Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt (JetSorb-Kit, Genomed, Bad Oeynhausen).

4.5.10 Ethanol-Fällung der DNA

(Ausubel et al., 1993; Crouse und Amorese, 1987)

Eine Ethanolfällung reinigt DNA von Proteinen und Verunreinigungen. Dabei wird die DNA mit 2,5 Volumenanteilen absolutem Ethanol und 0,1 Volumenanteil Natriumacetat (3 M) versetzt und für 15 Minuten auf $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach einem Zentrifugationsschritt (30', $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 13 000 rpm) wird der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Das Pellet wird in 30 μl sterilem Wasser aufgenommen.

4.5.11 Behandlung mit alkaliner Phosphatase (CIP)

Eine Behandlung mit alkaliner Phosphatase dephosphoryliert freie 5' Enden von verdauten Vektormolekülen, was die Wahrscheinlichkeit einer Religation vermindern soll. Dazu werden die gefällten Vektoren mit 4 μl Puffer und 2 μl alkaliner Phosphatase (CIP) versetzt und eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Eine Ethanol-Fällung trennt die DNA von den Proteinen.

4.5.12 Ligation von DNA-Fragmenten

(Gassen und Schrimpf, 1999)

Vor der Ligation werden 1 μl des gezippten Vektors neben 1 μl des zu klonierenden Fragments und 10 μl des Lambda-Markers (250 μg λ -DNA vollständig mit EcoRI und Hind III geschnitten) auf ein Agarosegel aufgetragen. Von diesem Gel können schließlich die DNA-Mengen der Proben geschätzt werden, was wiederum zu einer Bestimmung der in die Ligationen einzusetzenden Mengen führte. Dabei sollten Vektor und Insert äquimolar eingesetzt werden. Der Vektor wird mit dem Fragment und 1 U T4-Ligase sowie 2 μl 10x Ligase-Puffer in 20 μl Gesamtvolumen eingesetzt. Die Ligation erfolgt über Nacht bei $18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.13 Transformation in chemisch kompetente Zellen

(Sambrook et al., 1989)

Die Transformation nach der Ligation erfolgt mit 10 μ l des Ligationsansatzes in chemisch kompetente Zellen (vergleiche 'Klonieren mit dem TOPOTM-TA-Vektor-Kit': 30' Inkubation auf Eis, 30" Hitzeschock auf 42 °C, 5' auf Eis, Zugabe von 250 μ l LB-Medium, 45' Schütteln bei 37 °C, Ausplattieren). Erneut werden von einigen der Kolonien der Transformation Übernachtskulturen im Mini-Maßstab angeimpft und eine Plasmidpräparation durchgeführt. Zeigt der anschließende Restriktionsverdau Konstrukte in der richtigen Größe, wird schließlich noch eine Plasmidpräparation im Midi-Maßstab durchgeführt. Eine Sequenzierung stellte sicher, dass es sich bei dem Insert wirklich um das gewünschte Fragment handelt.

4.5.14 Die Theorie des CytoTrap Vector Kits, Stratagene

Das CytoTrap Vector Kit der Firma Stratagene (La Jolla, Californien) ist ein System mit dessen Hilfe man Protein-Interaktionen *in vivo* nachweisen kann. Dabei kommt der cdc25H-Hefestamm zur Verwendung, der eine Punktmutation im *CDC25*-Gen enthält. Dieses Gen codiert für einen Guanin Exchange Faktor (GEF), der den Ras-Signal-Transduktionsweg aktiviert. Durch die Mutation wird ein Wachstum der Hefezellen bei 37 °C verhindert, während die Zellen bei der permissiven Temperatur von 22 – 25 °C in ihrem Wachstum nicht eingeschränkt sind.

Das CytoTrap Vektor-Kit beinhaltet einen Vektor (pSos), der vor der multiplen Klonierungsstelle das humane Sos-Protein (hSos) enthält bzw. einen (pMyr), der nach der Ligation für ein Fusionsprotein mit einer Myristylierungssequenz codiert. Die Myristylierungssequenz bewirkt eine Verankerung an der Zellmembran der Hefezelle während hSos den Ras-Signalweg aktiviert. Falls die beiden in die Vektoren ligierten Proteine miteinander interagieren, wird das hSos-Fusionsprotein zu der Zellmembran rekrutiert, woraufhin eine Ras-Signalweg-Aktivierung und somit das Zellwachstum angeregt wird. Dazu wird ein Galaktose-haltiges Medium benötigt, da pMyr einen Galaktose-induzierbaren Promotor enthält, der für die Expression des Fusionsproteins stimuliert werden muss.

4.5.15 Herstellung kompetenter cdc25H-Hefezellen und deren Transformation

(CytoTrap Vector Kit, Stratagene, La Jolla, Californien)

Nach Anleitung des CytoTrap Vector Kits von Stratagen wurden kompetente Hefezellen hergestellt. Dazu wird der cdc25H α -Hefestamm verwendet. Eine Kolonie dieses Hefestammes wird benutzt, um eine 50 ml YPD-Übernachtskultur (enthält 2% Glucose) anzuimpfen. Über Nacht sollte diese Kultur auf eine OD₆₀₀ von > 1 anwachsen (Inkubation bei 22-25 °C). Durch eine Verdünnung lässt sich eine OD₆₀₀ von 0,2 einstellen. Nach weiteren drei Stunden Inkubation sollte sich eine OD₆₀₀ von > 0,7 eingestellt haben. Nun ist sichergestellt, dass sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. 75 μ l dieser Kultur werden zur Kontrolle auf Revertanten auf eine YPD-Platte ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Diese Platte wurde benutzt, um die Häufigkeit von Temperatur-sensitiven Revertanten abzuschätzen. Die restlichen Zellen wurden nacheinander in Wasser und LiSORB gewaschen, mit Heringssperma-DNA versetzt und in PEG/LiAc und DMSO aufgenommen (genaue Anweisungen siehe Anleitung des CytoTrap Vector Kits von Stratagene, La Jolla, Californien).

Bei der Transformation der Hefezellen werden je 300 ng der Konstrukte (Inserts + pMyr/pSos) zu 100 μ l kompetenter Zellen gegeben. Die verschiedenen Positiv- und Negativ-Kontrollen lassen sich Tabelle 5.5 entnehmen. Zu jedem Transformationsansatz werden 2 μ l 1,4 M β -Mercaptoethanol gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt ein Hitzeschock (42 °C, 20 Minuten), der die Aufnahme der Konstrukte bzw. der Kontrollvektoren in die Hefezellen gewährleisten soll. Nach drei Minuten auf Eis können die Zellen durch Zentrifugation (14 000 rpm, 30 Sekunden) pelletiert und anschließend in 0,5 ml 1 M Sorbitol resuspendiert werden. Die Transformationsansätze der eigenen Konstrukte werden mit Hilfe steriler Glasperlen auf SD/Glucose(-UL)-Platten ausplattiert und 4-6 Tage bei 22-27 °C gelagert. Die benutzten Platten der Kontrollen sind in Tabelle 5.5 aufgeführt. Nach 4-6 Tagen sollten alle Platten Hefekolonien aufweisen, da 22-25 °C der permissiven Temperatur entspricht und die Mutation des cdc25H-Stamms keine Wirkung ausübt. Die Kolonien müssen daher anschließend noch bei 37 °C (nicht-permissive Temperatur) getestet werden. Dazu werden pro Platte mindestens drei Kolonien gepickt und diese in 25 μ l sterilem, destilliertem Wasser resuspendiert. 2,5 μ l dieser Resuspension werden schließlich auf je zwei SD/Glucose (-UL) und zwei SD/Galactose (-UL)-Platten platziert und je-

weils bei 37 °C und 25 °C inkubiert. Nach 7 bis 10 Tagen sollen alle Platten, die bei permissiver Temperatur (22 – 25°C) inkubiert wurden, Kolonien zeigen, während alle SD/Glucose (-UL)-Platten bei 37 °C kein Wachstum zeigen sollen. pMyr besitzt nämlich einen Galactose-Promotor, der aktiviert werden muss, um das Beute-Fusionsprotein zu exprimieren. Bei den SD/Galaktose (-UL)-Platten, die auf 37 °C gelagert werden, sollten alle Hefen, die zwei interagierende Proteinkonstrukte enthalten, ein Wachstum erkennen lassen.

4.5.16 SDS-PAGE

(Sambrook et al., 1989)

Ansatz Trenngel (15 %):

15 ml	Acrylamid (30%)
7,5 ml	Trenngelpuffer (4x)
7,4 ml	Wasser
90 µl	Ammoniumpersulfat (APS)
24 µl	TEMED

Ansatz Sammelgel (4 %):

2 ml	Acrylamid (30%)
3,75 ml	Sammelgelpuffer (4x)
9,2 ml	Wasser
60 µl	Ammoniumpersulfat (APS)
12 µl	TEMED

Eine SDS-PAGE trennt Proteinen nach ihrem Molekulargewicht auf. Dazu werden die Proben nach einem zehn minütigen Denaturierungsschritt bei 95 °C mit SDS-haltigen Probenpuffer versetzt, was für eine gleichmäßige negative Ladung aller Proteine sorgt. Daher sollten sich die Proteine ausschließlich nach der Größe auftrennen. Das Sammelgel überschichtet das Trenngel und dient zur Sammlung der Proteine, was ein gleichzeitiges Eintreten aller Proteine in das Trenngel gewährleistet.

Nach ca. 2 Stunden bei 200-250 Volt sollten sich die Proteine in dem Trenngel auftrennen. Das Sammelgel kann nun entfernt werden, während das Trenngel in einer Coomassie-Färbelösung gefärbt wird. Nach einer sich anschließenden, ca. zweistündigen Inkubation in Entfärbelösung sollten die Proteine sichtbar sein. Das Trenngel wird dann auf einem Whatmann-Papier getrocknet. Anschließend wird das getrocknete Gel zur Belichtung im Dunkeln auf einen Film gelegt.

5 Ergebnisse

5.1 In *blow*²-mutanten Embryonen kann immunhistologisch kein Blow-Protein detektiert werden

Eine Involvierung des PH-Domänen-Proteins Blown fuse in den Myoblastenfusionsprozess konnte bereits 1997 durch Analysen von mutanten Tieren gezeigt werden (siehe 2.4, Doberstein et al., 1997). Den *blow*²-mutanten Phänotyp zeigt Abbildung 5.1C im Vergleich zu wildtypischen Embryonen (Abb. 5.1A). Dabei ist klar zu erkennen, dass die *blow*²-Mutanten einen sehr starken Fusionsdefekt aufweisen und keine Myotuben mit wildtypischer Kernzahl ausbilden können. Der in Doberstein et al., (1997) beschriebene 'bunch of grapes'-Phänotyp, bei dem sich die Fusions-kompetenten Myoblasten (FCMs) an die Precursorzelle anlagern, aber nicht fusionieren können, ist in Abbildung 5.1C (Pfeil) zu sehen.

Seit 2006 ist bekannt, dass Blow nur in den FCMs und nicht etwa wie zuerst vermutet in beiden Zelltypen exprimiert wird (Schröter et al., 2006). Das Expressionsmuster ist in der Färbung mit dem gegen den N-Terminus des Blow-Proteins gerichteten Antikörper in Abb. 5.1B zu erkennen. Um zu überprüfen, ob Blow in *blow*²-Embryonen noch exprimiert wird, wurde eine immunhistologische Analyse an *blow*²/CyO, *hg-lacZ*-Embryonen mit dem anti-Blow Antikörper sowie mit anti- β -Galaktosidase durchgeführt. Eine *lacZ*-Färbung im Hinterdarm zeigt bei dieser Färbung, dass ein Balancerchromosom in dem jeweiligen Embryo vorliegt. Dabei zeigen ausschließlich Embryonen mit Balancer-Färbung auch eine Färbung mit anti-Blow (nicht gezeigt), während mutante Embryonen keine Blow-Färbung aufweisen. Um sicher zu gehen, dass nicht zufällig nur in diesen Embryonen die Färbung nicht funktioniert hat, wurden *blow*²/CyO, *hg-lacZ*-Embryonen in einem anderen Experiment neben anti-Blow auch noch mit anti- β -Tubulin gefärbt. Ein solcher Embryo ist in Abbildung 5.1D gezeigt. Aufgrund des sehr gestörten Muskelmusters ist davon auszugehen, dass es sich um einen *blow*²-mutanten Embryo handelt. Während in Embryonen mit wildtypischem β 3-Tubulin-Muster auch

eine Blow-Verteilung in der Schwarzfärbung wie in Abb. 5.1B zu sehen ist, ist in dem gezeigten Embryo offensichtlich kein Blow detektiert (Abb. 5.1D).

Zusammengenommen zeigen diese Färbungen, dass in *blow²*-Embryonen kein restliches Blow-Protein vorhanden ist, das der anti-Blow-Antikörper nachweisen kann. Es scheint sich also um eine Nullmutante zu handeln.

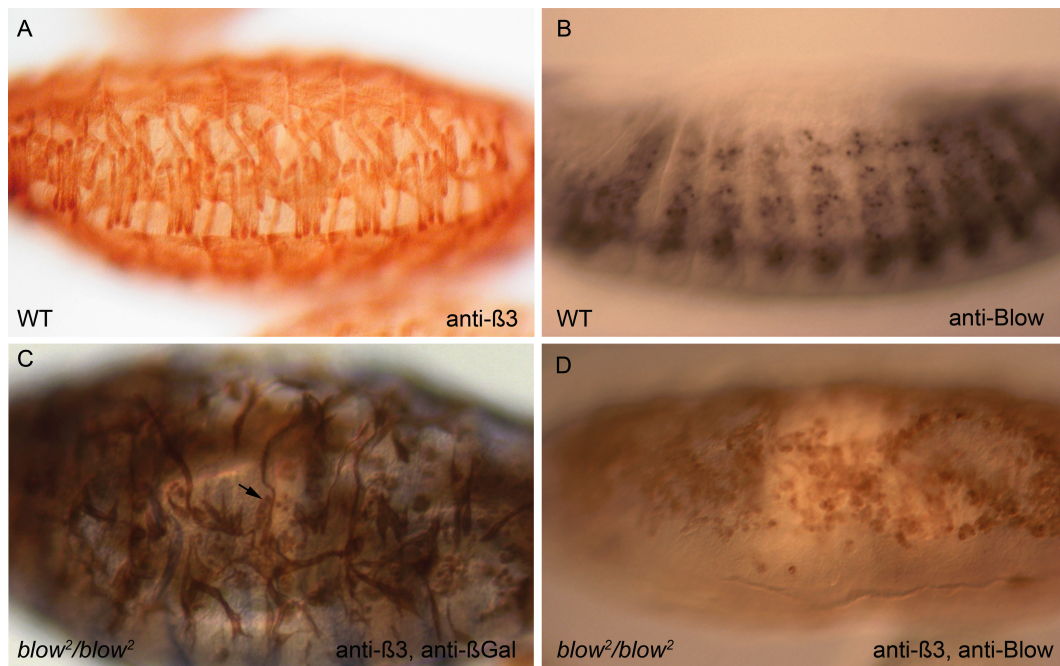


Abbildung 5.1: Blow wird in den FCMs exprimiert und *blow²*-Embryonen zeigen einen starken 'bunch-of-grapes'-Phänotyp sowie kein Blow-Protein. (A) Eine anti- β 3-Tubulin-Färbung an einem wildtypischen Embryo lässt das geordnete Muskelmuster gut erkennen. (B) Die Anti-Blow Antikörperfärbung an einem Wildtypembryo verdeutlicht, dass Blow in den FCMs exprimiert wird. (C) Eine anti- β 3-Tubulin-, anti- β -Galaktosidase-Färbung an homozygoten *blow²*-Embryos visualisiert das Muskelmusters bzw. die Existenz eines Balancers. Es finden keine Fusionen nach dem Precursor-Stadium statt. FCMs können sich aber noch an die Precursorzelle anlagern (Pfeil) ohne zu fusionieren ('bunch of grapes'). (D) Eine anti-Blow, anti- β 3-Tubulin-Doppelfärbung an einem homozygoten *blow²*-Embryo zeigt, dass *blow²* Mutanten kein detektierbares Blow-Protein mehr exprimieren. Die anti- β 3-Tubulin-Färbung ist in braun gefärbt, während Blow-Protein in schwarz sichtbar wäre.

5.2 Die *blow²*-Mutante weist eine Deletion im zweiten Exon auf

Obwohl das *blow²*-Allel schon 1993 durch eine EMS-Mutagenese erzeugt wurde und 1997 für die *Drosophila*-Myoblastenfusion beschrieben wurde, ist bis heute keine molekulare Analyse des Allels veröffentlicht worden (Van Vactor et al., 1993, Doberstein et al., 1997). Durch eine Sequenzierung des Allels mittels Einzel-Embryo-PCRs ist es in dieser Arbeit gelungen, das Allel molekular zu beschreiben. Dazu wurden *blow²/CyO*, *hg-lacZ*-Embryonen mit Antikörpern gegen β 3-Tubulin und β -Galaktosidase gefärbt,

so dass sowohl das Muskelmuster als auch die Balancerfärbung zu sehen sein sollte. In der Folge wurden die Embryonen, die sowohl einen starken Fusionsphänotyp als auch keine Balancerfärbung zeigten aussortiert, da bei diesen Tieren davon ausgegangen werden kann, dass sie homozygoter Träger des *blow*²-Allels sind. Mit insgesamt sieben Primerpaaren, die überlappend die Exons sowie die 5'UTR des *blow*-Gens überspannen, wurden Einzel-Embryo-PCRs an diesen Embryonen durchgeführt (siehe 5.2).

Dabei wurden folgende Unterschiede im Vergleich zu der auf FlyBase veröffentlichten Sequenz gefunden: An Position 1864, also noch in der 5' UTR des Gens, hat ein Austausch von Adenin zu Guanin statt gefunden. Am Ende des zweiten Introns, an Position 4067, besteht ein Austausch von Thymin zu Cytosin und im Anschluss daran folgt eine kleine Deletion von Base 4069 bis 4340, also von 271 Basenpaaren Länge. Diese Deletion liegt über der Intron-Exon-Grenze des zweiten Introns/Exons, so dass das gesamte zweite Exon nicht als solches erkannt werden kann und daher im fertigen Protein deletiert ist. Ein weiterer Basenaustausch von Thymin nach Cytosin an Position 4402 liegt nach der Deletion im zweiten Exon und hat also voraussichtlich keine weitere Folge mehr für das Protein. Da das dritte Exon 'in frame' mit dem ersten Exon liegt, findet ein Rasterschub darüber hinaus nicht statt.

Während EMS-Mutagenesen Punktmutationen in großer Menge produzieren, sind kleine Deletionen nach Pastnik et al. (1991) weniger häufig, kommen aber auch regelmäßig vor. Die Tatsache, dass die kleine Deletion im *blow*²-Allel schon nach 55 kodierenden Basenpaaren des Gens auftritt, harmoniert mit dem Befund, dass der anti-Blow-Antikörper kein Blow-Protein in *blow*²-Mutanten nachweisen kann. Der anti-Blow Antikörper ist gegen die Aminosäuren 8 – 194, also gegen den N-Terminus, gerichtet. Da das erste, unbeschädigte Exon des Gens nur für 18 Aminosäuren kodiert, verbleiben letztlich nur zehn Aminosäuren des Bereiches gegen den der Antikörper gerichtet ist im mutanten Protein.

Neben diesen für *blow*² spezifischen Unterschieden wurden außerdem noch einige Basenaustausche im Vergleich zu der in FlyBase veröffentlichten Sequenz gefunden, die jedoch nicht mit der Mutation in Verbindung zu stehen scheinen. Dabei handelt es sich um vier Austausche, die auch in der embryonalen cDNA-Bank LD (Stapleton et al., 2003) zu finden sind und die damit auch in der daraus abgeleiteten cDNA von *blow*^{FL} enthalten sind. Die Funktion des Proteins beeinträchtigen diese vier Basenaustausche voraussichtlich nicht. Es handelt sich dabei um die Austausche in der cDNA von Blow an Position 1416 (C zu T, still), 1436 (T zu C, Valin zu Alanin), 1507 (A zu G, Lysin

zu Glutamat), 1690 (T zu G, Tyrosin zu Aspartat). Bei diesen Austauschen handelt es sich wahrscheinlich um Populationspolymorphismen.

Durch immunhistochemische Färbungen an *blow²*-Embryonen mit dem anti-FASIII-Antikörper wurde außerdem aufgezeigt, dass die *blow²*-Linie einen weiteren Treffer trägt (persönliche Kommunikation S. Berger). Offensichtlich wird gar kein FASIII mehr in *blow²*-Embryonen gebildet. Daher scheint das FASIII-Gen oder zumindest ein Gen, das für die Bildung/Stabilisierung von FASIII essentiell ist, betroffen zu sein. Da dieser Treffer für die weiteren Analysen aber ohne Bedeutung ist, wurde kein Versuch unternommen, diese zweite Mutation zu charakterisieren.

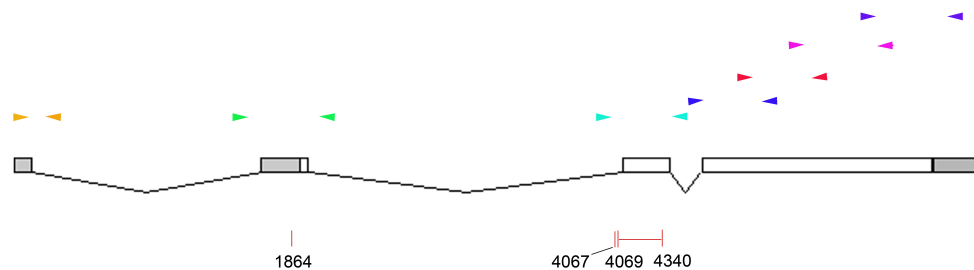


Abbildung 5.2: Sequenzierung des *blow²*-Allels Die Sequenzierung des *blow²*-Allels wurde mittels Einzel-Embryo-PCR an Embryonen durchgeführt, die sowohl einen starken Fusionsphänotyp als auch eine fehlende Balancerfärbung erkennen ließen. Die farbigen Pfeilköpfe zeigen die Lage der sieben Primerpaare an, die benutzt wurden. Dunkelgrau gefüllte Felder repräsentieren die UTRs des Gens, während weiße Felder die Exons repräsentieren. Unterhalb des Gens sind die Basenaustausche und die Deletion von *blow²* gezeigt. Der Basenaustausch, der nach der Deletion im zweiten Exon liegt, ist hier nicht gezeigt.

5.3 Die *in silico*-Analysen der Aminosäure-Sequenz von Blow zeigen viele Phosphorylierungs- und Bindemotive

Um sich der Funktion und Regulation des Blow-Proteins anzunähern, wurde in der 2006 abgeschlossenen Dissertation von R.H. Schröter eine *in silico*-Analyse des Blow-Proteins durchgeführt. Da die Algorithmen der Analyseprogramme in den letzten Jahren weiterentwickelt wurden und mehr Vergleichsdaten der Forschungsgemeinschaft zugänglich gemacht wurden, ergab eine erneute *in silico*-Analyse ein verändertes Bild,

das hier in der aktuellen Version präsentiert werden soll.

Nach wie vor sagt eine Analyse der Aminosäure-Sequenz mit dem SMART-Search-Tool des EMBL Heidelberg (Schultz et al., 1998; Letunic et al., 2008) nur eine Domäne für Blow vorher: Die Aminosäuren 205 bis 306 bilden eine PH-Domäne. Neben dieser Domäne können mit verschiedenen Analyseprogrammen noch weitere Motive in Blow gefunden werden, die für die Funktion des Proteins von Bedeutung sein können. Dabei wird die Aminosäure-Sequenz des Proteins mit bekannten Sequenzen oder Sequenz-Fragmenten verglichen, so dass gleiche oder ähnliche Sequenzmotive als putative Phosphorylierungs- oder Interaktionsstellen aufgezeigt werden können. Da diesen Analysen nur die Primärstruktur des Proteins zugrunde liegt, müssen die gefunden Interaktionen stets noch experimentell bewiesen werden.

5.3.1 Die Suche nach putativen Phosphorylierungsstellen in Blow

Der NetPhos 2.0-Server sucht nach putativen Phosphorylierungsstellen in Proteinen (Blom et al., 1999). Dabei wurden für Blow 45 Serine, 9 Threonine und 11 Tyrosine als putativ phosphoryliert ausgegeben (siehe Tabelle 5.1), von denen nicht alle in Binde-motiven für spezifische Kinasen liegen (s. u.). Aminosäurereste, die in der PH-Domäne liegen, werden nur in Klammern angegeben. Phosphorylierungen, die mit einer Wahr-scheinlichkeit von weniger als 50 % angegeben wurden, wurden nicht berücksichtigt.

Aminosäure	Anzahl	Position
Serin	45	27, 31, 66, 68, 70, 92, 116, 118, 120, 122, 123, 125, 127, 136, 143, (205, 249, 250, 257, 258), 314, 333, 346, 368, 392, 397, 399, 451, 462, 464, 467, 477, 492, 495, 498, 499, 502, 532, 541, 559, 574, 583, 599, 603, 617
Threonin	9	7, 8, (206, 224), 318, 391, 436, 481, 636
Tyrosin	11	33, 130, 192, (208, 239, 253, 287), 335, 342, 463, 556

Tabelle 5.1: putative Phosphorylierungsstellen in Blow. Angezeigt werden nur die durch NetPhos 2.0 mit einer Wahrscheinlichkeit von über 50 % angegebenen Phosphorylierungsstellen. Die in Klammern angegebenen putativen Phosphorylierungsstellen liegen in der PH-Domäne.

5.3.2 Die Suche nach Protein-Protein-Bindemotiven

Auch bei der Suche nach ELMs (Eukaryotischen Linearen Motiven) mittels des ELM-Servers (Puntervoll et al., 2003) zeichnet sich inzwischen ein verändertes Bild im Vergleich zu der Dissertation von R.H. Schröter, aber nach wie vor gilt, dass Bindemotive für klassische SH2-Domänen, Grb-like SH2-Domänen, PTP2-like SH2-Domänen, SH3-Domänen (Klasse I, Klasse II und nicht-kanonisch), WW-Domänen der Gruppe III und Gruppe IV und PDZ-Domänen gefunden wurden. Darüber hinaus finden sich Stellen für Interaktionen mit Proteinen 14-3-3 und Cyclin (siehe Tabelle 5.2). Die Stellen für FHA-Domänen bzw. die Stelle für IQ-Domänen sind dagegen nicht mehr angezeigt worden. Erstmals gefunden wurden ein Bindemotiv (KEN), das für die Bindung an die APC/C-Untereinheit Cdh1 und somit für die Degradierung des Proteins nötig ist, sowie ein Motiv für die MAPK1 und drei Motive für die STAT5 SH2-Domäne. Bei dieser Analyse sind die Sequenzen in der PH-Domäne nicht beachtet worden, da die Motive je nach Faltung des Proteins räumlich für andere Proteine nicht erreichbar sind und die in der Domäne gefundenen ELMs durch eine weitere Analysen in ScanSite 2.0 (siehe unten) nicht bestätigt werden konnten. Die Ergebnisse der Analyse mit dem ELM-Server werden in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Der ELM-Server kann darüber hinaus dafür genutzt werden, Substratmotive zu finden, die von Proteinkinasen erkannt werden. Dabei ergibt sich ein Bild wie in Tabelle 5.3 dargestellt. Blow verfügt darin über putative Phosphorylierungsstellen für die CDK, CK1, CK2, PKA und Prolin-dirigierte Kinasen (wie z. B. MAPK).

Zusätzlich wurde eine Analyse mit Scansite 2.0 durchgeführt (Obenauer et al., 2003). Dieses Programm sucht nach Bindestellen für Domänen von spezifischen Proteinen. Auch bei dieser Analyse wurden die Treffer in der PH-Domäne außer Acht gelassen. In Scansite 2.0 können verschiedene Sensitivitäten eingestellt werden. Bei dem 'High Stringency Scan' werden acht Bindedomänen in Blow angezeigt (Tabelle 5.4), dabei handelt es sich um Bindemotive zweier SH3-Domänen (von p85 und Crk), um Bindemotive von PKC sowie um ein Motiv für die Lck SH2-Domäne. Ferner können mehrere Kinasen, z. B. mit ihrer SH2-Domäne binden; dabei scheint besonders das Tyrosin 342 von Bedeutung zu sein, da es in den Bindemotiven, die von verschiedenen Proteine erkannt werden, liegt (vgl. Dissertation R.H. Schröter, 2006).

putative Bindedomäne	Aminosäure-Sequenz in Blow	Position
SH2 (klassisch)	Y[QDEVAIL][DENPYHI] [IPVGAHS]	342-345, 627-630
SH2 (PTP2-like)	Y[IV].[VILP]	130-133
SH2 (Grb2-like)	Y.N.	33-36, 463-466
SH3 (Klasse I)	[RKY]..P..P	322-328, 378-384
SH3 (Klasse II)	P..P.[KR]	360-365
SH3 (nicht-kanonisch)	...[PV]..P	141-147, 322-328, 357-363, 378-384, 381-387, 565-571, 569-575, 626-632
WW (Gruppe III)	.PPR.	319-323
WW (Gruppe IV)	...[ST]P.	113-118, 115-120, 31-320, 323-328, 343-348, 365-370, 448-453, 470-475, 474-479, 478-483, 492-497, 496-501, 529-534, 556-561, 567-572, 571-576, 633-638
PDZ (Klasse III)	.[DE].[IVL]	55-58, 94-97, 111-114, 128-131, 338-341, 402-405, 452-455, 469-472, 505-508, 543-546, 604-607, 627-630
14-3-3	[RHK][STALV].[ST].[PESRDIF]	323-328, 365-370, 394-399, 491-496, 597-602
Cyclin	[RK].L{0,1}[FYLVIMP]	322-325
KEN	.KEN.	542-546
MAPK 1	[KR]{0,2}[KR].{0,2}[KR].{2,4} [IVLM].[IVLF]	582-589
STAT 5	Y[VLTFIC]..	110-113, 130-133, 335-338

Tabelle 5.2: Bindemotive für Protein-Protein-Interaktionen in Blow. Auflistung aller Eukaryotischen Linearen Motive in Blow nach dem ELM-Server, außer Kinase-Motiven (siehe Tabelle 5.3) und Motiven, die in der PH-Domäne von Blow liegen.

Kinase	Aminosäure-Sequenz in Blow	Position
CDK	...([ST])P.[KR]	115-121, 448-454, 478-484
CK1	S..([ST])...	27-33, 63-69, 120-126, 122-128, 135-141, 333-339, 439-445, 467-470, 473-479, 492-498, 495-501, 499-505, 570-576, 614-620
CK2	...([ST])..E	28-34, 40-46, 67-73, 464-470, 538-544, 545-551, 614-620
GSK3	...([ST])...[ST]	24-31, 61-68, 63-70, 113-120, 115-122, 120-127, 311-318, 363-370, 390-397, 418-425, 436-443, 439-446, 470-477, 474-481, 491-498, 492-499, 495-502, 523-530, 525-532, 527-534, 567-574, 592-599, 596-603, 614-621, 632-639
PKA	[RK][RK].[ST]...	24-30, 89-95, 140-146, 331-337, 498-495, 490-496
PLK	[DE].[ST][ILFWMVA]..	45-51
ProDKin	...([ST])P..	113-119, 115-121, 315-321, 323-329, 343-349, 365-371, 448-454, 470-476, 474-480, 478-484, 492-498, 496-502, 529-535, 556-562, 567-573, 571-577, 633-639

Tabelle 5.3: Bindemotive für Kinase-Interaktionen in Blow. Auflistung der Kinase-Bindemotive laut des ELM-Servers, die nicht in der PH-Domäne des Proteins liegen.

putative Bindestelle	Aminosäure-Motiv in Blow	Protein
P325	TPPPRKLPVQKK	p85-SH3 (mode I)
P328	PRKLPVQKKSTY	p85-SH3 (mode II)
T334	PPVQKKSTYTAADII	PKC epsilon
Y342	YTAADIIYEESPVY	Lck SH2 Abl SH2 Nck SH2 Fyn SH2 Itk SH2 Src SH2
Y349	YEESPVYGLIDSSS	SHIP SH2
P360	DSSMVLPKLPEKSN	Crk SH3
S473	GSEPEMLSPLTSPAQ	Erk Kinase
S477	EMLSPLTSPAQTPTK	GSK3 Kinase

Tabelle 5.4: Bindemotive für Domänen spezifischer Proteine in Blow. Auflistung der im 'High Stringency'-Modus gefundenen Bindemotive nach ScanSite 2.0. Bindemotive in der PH-Domäne wurden nicht aufgeführt.

Bei Benutzung von ScanSite mit dem 'Medium Stringency'-Modus werden sehr viele weitere putative Bindestellen für andere Proteine vorhergesagt: Neben einer Interaktion mit dem Protein 14-3-3 werden Interaktionen mit Kinase-Domänen der Abelson-Kinase und der Src-Kinase an der Aminosäure Y342, sowie von Src- und Lck-Kinasen an Y349 vorhergesagt. Zusammen mit den SH2-Interaktionen verschiedener Kinasen, die in Tabelle 5.4 aufgeführt sind, erscheint Y342 daher als sehr wahrscheinlicher Kandidat für ein Kinase-Bindemotiv.

Neben den Kinasen wird eine Interaktion mit der SH2-Domäne des Adaptor-Proteins Nck an Y342 vorhergesagt.

Für ein weiteres Adaptorprotein, Crk, wird im 'Medium Stringency'-Scan eine Interaktion der SH2-Domäne mit Y378 von Blow vorhergesagt, was bedeutet, dass Crk für zwei verschiedene Aminosäurereste als Interaktionspartner vorhergesagt wurde (P360, 'High Stringency' und Y378, 'Medium Stringency'). Für beide Aminosäuremotive hat auch der ELM-Server eine Interaktion mit SH3-Domänen vorhergesagt, allerdings wurde für diese Aminosäuren keine Phosphorylierung vorhergesagt (5.1).

Weitere Interaktionen von Blow mit SH2-Domänen werden für PLC γ , Fgr und Grb2 im 'Medium Stringency'-Modus vorhergesagt. Neben diesen individuell betrachteten Interaktionen werden viele basophile, acidophile und prolin-abhängige Serin-/Threonin-Kinase-Gruppen als mögliche Interaktionspartner dargestellt, für deren direkte Involvierung in den Myoblastenfusionsprozess keine Hinweise gefunden werden konnten.

Stellt man die Daten der NetPhos-, ELM Server- und ScanSite-Analysen in Kontext zueinander, fällt auf, dass Y342 in allen drei Analysen als Motiv gefunden wird. NetPhos sagt eine Phosphorylierung des Tyrosins vorher. Der ELM-Server und ScanSite geben Y342 als Motiv für eine SH2-Bindung ('High Stringency' in ScanSite) bzw. für eine SH2- oder eine Kinase-Domäne aus ('Medium Stringency' in Scan Site). Die ScanSite-Analyse findet dabei neben verschiedenen Kinasen den Adaptor Nck als putativen Interaktionspartner von Y342. Anders als in der Dissertation von R.H. Schröter (2006) gezeigt, gibt das ScanSite-Programm heute aber die Bindung von Y342 mit gleicher Wahrscheinlichkeit für alle Kinasen an. Die Phosphorylierung von Y349 durch Src wie sie von ScanSite im 'Medium Stringency'-Modus vorhergesagt wurde, scheint nach einer NetPhos-Analyse unwahrscheinlich. Außerdem wurde P325 mit einer Interaktion mit der SH3-Domäne von Src, nicht aber mit einer Interaktion von SH3 der Abelson-Kinase assoziiert (ScanSite 2.0), es sei denn man wendet den 'Low Stringency'-Modus an.

Zellkulturexperimente in C2C12-Zellen, die eine Kolo-kalisierung von phosphoryliertem Tyrosin und transfiziertem Blow zeigen sollten, konnten keinen Aufschluss über die posttranslationale Modifizierung von Blow geben (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der drei Analysen werden in Abbildung 5.3 zusammengefasst. Zur besseren Übersichtlichkeit werden dabei allerdings nur die Befunde aus dem 'High Stringency'-Modus erfasst. Das bedeutet, dass die zweite Crk-Bindestelle (Y378), sowie die Bindung von Kinase-Domänen an Y342, die Bindung von Y349 durch Src und einige weitere Interaktionen mehr nicht aufgeführt werden.

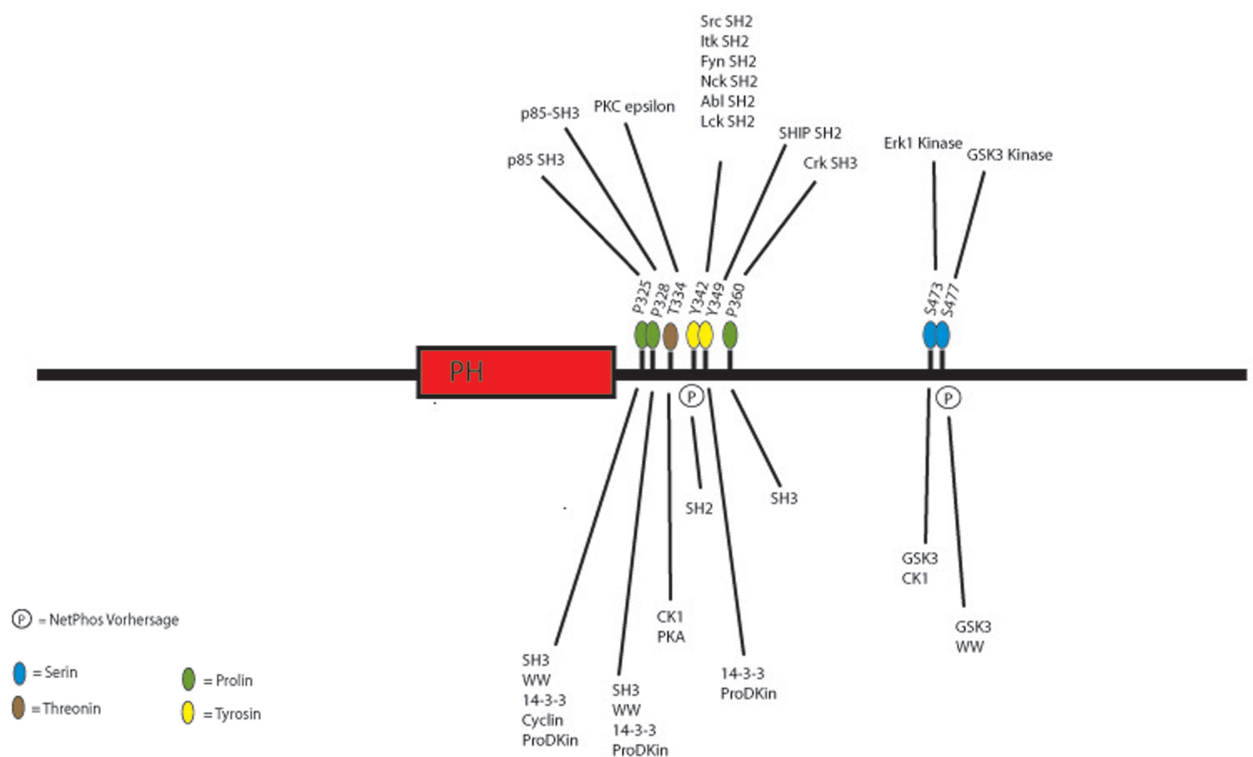


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung von Blow. Das Bild zeigt alle putativen Bindemotive und Phosphorylierungsstellen, die sowohl in NetPhos 2.0 als auch im ELM-Server und im High Stringency Modus in ScanSite 2.0 gefunden werden und die nicht in der PH-Domänen liegen. Oberhalb des Proteins sind die Ergebnisse aus ScanSite 2.0 dargestellt, während die Ergebnisse aus dem ELM-Server unterhalb des Proteins dargestellt sind.

5.4 Blow Δ N-113 interagiert nicht mit der Spleißvariante CrkS des Adaptorproteins Crk

Die *in silico*-Analyse (5.3) ergab, dass das Adaptorprotein Crk mit hoher Wahrscheinlichkeit ein putativer Interaktionspartner von zwei verschiedenen Motiven von Blow ist. Darüber hinaus wurde in einem globalen Hefe-2-Hybrid-Screen eine Interaktion von Blow und Crk gefunden (Giot et al., 2003). Diese Verbindung von Blow und Crk ist von besonderer Bedeutung, da für Crk eine Funktion in der Myoblastenfusion postuliert wurde und eine Interaktion von Crk mit dem DOCK180-Homolog Myoblast city bewiesen ist (Galletta et al., 1999).

Da noch nicht geklärt werden konnte, wie das Signal zur Zell-Zell-Fusion von dem Adaptormolekül Sns (siehe 2.2.4) weiter zu dem Blow-Molekül vermittelt wird, erlaubte die postulierte Interaktion von Crk und Blow eine interessante Hypothese. Demnach könnte die Signaltransduktionskette von Sns über Mbc und Crk hin zu Blow führen (Diplomarbeit A. Sickmann 2005, Dissertation Roxane H. Schröter, 2006).

Um zu testen, ob Crk *in vivo* mit Blow interagiert, wurde ein Hefe-2-Hybrid-Interaktionstest mit dem Cyto Trap-Kit von Stratagene durchgeführt. In *Drosophila* werden durch differentielles Spleißen verschiedene Transkripte von Crk synthetisiert (FlyBase, Tweedie et al., 2009). Diese Transkripte unterscheiden sich u. a. in der SH2-Domäne des Proteins. Das Protein CrkS hat eine um 18 Aminosäuren kürzere SH2-Domäne als CrkL.

Schon in meiner Diplomarbeit 2005 wurde eine Interaktion von Blow mit der Spleißvariante CrkL überprüft. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine cDNA des vollständigen *blow*-Gens vorlag, wurde das sogenannte Blow Δ N-113, dem N-terminal 112 Aminosäuren fehlen, verwendet. Es konnte damals keine Interaktion von Blow Δ N-113 mit CrkL nachgewiesen werden. Parallel dazu wurde Blow Δ N-113-Y342H eingesetzt, das einen Basenaustausch trägt, der das Tyrosin 342 zu Histidin austauscht. Für diese Arbeit sollte der gleiche Test mit der Spleißvariante CrkS von Crk durchgeführt werden. Da ScanSite im 'Medium Stringency'-Modus eine Interaktion von Y378 mit der SH2-Domäne von Crk vorhersagt, könnte eine veränderte SH2-Domäne einen Unterschied in der Bindungsaffinität hervorrufen.

Bei der Benutzung des Cyto Trap-Kits wird ein *cdc25H*-Hefestamm verwendet, der eine Mutation im *CDC25*-Gen trägt. Dieses Gen kodiert einen Guanin Exchange Faktor (GEF), der den Ras-Signalweg aktiviert. Durch diese Mutation wird ein Wachstum

bei 37 °C verhindert, während die Zellen bei der permissiven Temperatur von 22 – 25 °C in ihrem Wachstum nicht eingeschränkt sind. Durch eine Interaktion der beiden Fusionsproteine wird humanes Sos-Protein an die Zellmembran rekrutiert und aktiviert dort den Ras-Signalweg. Das führt auf Galaktose-haltigen Platten zu einer Anregung des Zellwachstums bei 37 °C. Daher kann das Auftreten von Hefekolonien bei 37 °C eine Interaktion der beiden Fusionsproteine anzeigen (genauere Theorie des Cyto Trap-Kits siehe 4.5.14).

5.4.1 Etablierung des Cyto Trap-Hefe-2-Hybrid-Systems zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

Da sich in dem Cyto Trap-System Interaktionen durch Hefewachstum bei 37 °C zeigen, muss der mutante Phänotyp der *cdc25H*-Zellen kontrolliert werden. Völlig leere Hefezellen, die keinen Vektor enthalten, können durch die Verwendung von Auxotrophie-Markern nicht wachsen. In der Tat sind bei 37 °C nur zwei untransformierte Hefekolonien gewachsen, wobei laut Hersteller bis zu 30 Kolonien im gleichen Zeitraum vertretbar wären. Auch mit leerem pMyr- und pSos-Vektor transformierte Zellen zeigten keine Kolonienbildung. Der mutante Phänotyp des verwendeten Hefestammes war also nicht revertiert, und der Hefestamm konnte in den Versuch eingesetzt werden.

Zur weiteren Absicherung gegen falsch-positive Kolonienbildung wurde ein Galaktose-induzierbarer Promotor im pMyr-Vektor verwendet. Zellen, die auf Galaktose-freiem Medium bei 37 °C wachsen, hätten als falsch-positiv eingestuft werden müssen. Allerdings sind auch solche Fälle nicht aufgetreten, da nur minimale Kolonien auf Galaktose-freien Glukose-Platten aufgetreten sind. Schließlich wurden eine Reihe von Kontrollvektoren eingesetzt, von deren Fusionsproteinen sicher bekannt ist, dass sie interagieren bzw. nicht interagieren (zur Übersicht siehe Tabelle 5.5).

5.4.2 Weder Blow Δ N-113 noch Blow Δ N-113-Y342H zeigen im Cyto Trap-System Interaktionen mit CrkS

Für die Interaktionstests wurden *cdc25H*-Hefezellen mit pSos-CrkS sowie pMyr-Blow Δ N-113 oder pMyr-Blow Δ N-113-Y342H transformiert. Parallel dazu wurden die Kontrollansätze 5, 6, 7, 8, 10 und 11 in die Hefezellen transformiert (Tab. 5.5). Jeder dieser Transformationsansätze ist erwartungsgemäß bei der permissiven Temperatur von 25 °C gewachsen, da der mutante Genotyp des Hefestammes hier nicht zum Tragen

Nummer	Plasmide	erwartetes Wachstum bei 25 °C	erwartetes Wachstum bei 37 °C (SD/Glu)	erwartetes Wachstum bei 37 °C (SD/Gal)
1	pSos + pMyr	+	entfällt	entfällt
2	pSos MAFB	+	entfällt	entfällt
3	pMyr SB	+	entfällt	entfällt
4	pMyr Lamin C	+	entfällt	entfällt
5	pSos MAFB + pMyr MAFB	+	–	+
6	pSos MAFB + pMyr Lamin C	+	–	–
7	pSos Col I + pMyr MAFB	+	–	–
8	pSos MAFB + pMyr SB	+	–	+
9	pSos-Köder	+	entfällt	entfällt
10	pSos-CrkS + pMyr Lamin C	+	–	–
11	pSos-CrkS + pMyr SB	+	–	+
12	pSos-CrkS + pMyr BlowΔN-113	+	–	zu testen
13	pSos CrkS + pMyr BlowΔN-113-Y342H	+	–	zu testen

Tabelle 5.5: Übersicht der Transformationen in *cdc25H*-Hefezellen. Die Nummern 5, 8 und 11 sind Positivkontrollen, weil die Fusionsproteine der Kontrollvektoren miteinander interagieren. Dabei interagiert bei Nummer 11 das SB-Protein des pMyr SB-Vektors mit dem Sos-Protein des pSos-Vektors. Die Nummern 6, 7 und 10 repräsentieren dagegen die Negativkontrollen. Bei Nummer 12 und 13 handelt es sich um die eigentlichen Interaktionstests.

Es wurden je 300 ng jedes Plasmids und 100 μ l der kompetenten Zellen in die Transformation eingesetzt. Jeder Transformationsansatz zeigte Wachstum bei der permissiven Temperatur von 25 °C. Kein Transformationsansatz zeigte Wachstum bei 37 °C auf SD/Glucose-Platten.

kommt. Von diesen Platten wurden jeweils zehn Kolonien überimpft. Dabei wurde jede Kolonie auf je zwei SD/Galaktose (–UL)- und zwei SD/Glukose (–UL)-Platten überimpft, von denen je eine bei 22 bis 25 °C und eine bei nicht-permissiven 37 °C inkubiert wurde.

Alle Kolonien sind bei 22 bis 25 °C gewachsen, während es kaum Kolonienbildung bei 37 °C auf SD/Glukose (–UL)-Platten gab, was den Erwartungen entsprach, da hier der Galaktose-induzierbare Promotor von pMyr nicht eingeschaltet werden konnte (nicht gezeigt). Der eigentliche Interaktionstest fand auf SD/Galaktose (–UL)-Platten bei 37 °C statt. Dabei zeigten die Positivkontrollen Nummer 5, 8 und 11 deutliche Kolonienbildung, während die Negativkontrollen 6, 7 und 10 nur in sehr geringem Ausmaß Kolonien zeigten (Abb. 5.4 A, B und C). Die Kontrollen sprechen also für die Funktionalität des Interaktionstests. In Abbildung 5.4 D ist das Wachstum der Hefezellen zu sehen, die mit BlowΔN-113 und CrkS bzw. mit BlowΔN-113-Y342H und CrkS transformiert wurden. Gerade im direkten Vergleich mit den Positivkontrollen

in 5.4 A, B und C ist eine Kolonienbildung der Hefen nicht auszumachen. Vielmehr bleiben die sehr wenigen Kolonien klein und ähneln dem Hintergrundwachstum wie sie etwa auch bei der Negativkontrolle Nummer 10 zu sehen ist (5.4 C).

Der Cyto Trap Interaktionstest deutet also darauf hin, dass Blow Δ N-113 nicht physikalisch mit CrkS interagiert. Zusammen mit den Ergebnissen aus meiner Diplomarbeit lässt sich daraus schließen, dass Blow Δ N-113 mit keiner Isoform von Crk interagiert.

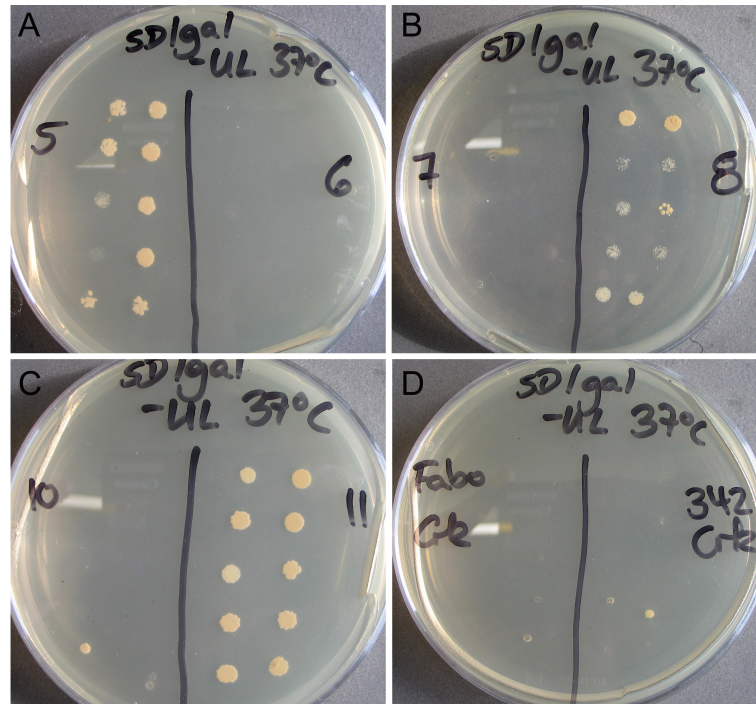


Abbildung 5.4: Blow Δ N-113 und Blow Δ N-113-Y342H zeigen keine Interaktion mit CrkS. Die Positivkontrollen 5, 8, und 11 zeigen deutliche Kolonienbildung. Die Negativkontrollen 6, 7 und 10 zeigen nur in extrem geringem Maße Kolonienbildung. Die Interaktionstests mit Blow Δ N-113 bzw. Blow Δ N-113-Y342H und CrkS zeigen keine deutliche Kolonienbildung. SD/gal = SD/Galaktose (-UL)-Platte. Fabo = Blow Δ N-113. 342 = Blow Δ N-113-Y342H. Crk = CrkS.

5.5 Transgene Fliegen mit UAS-Konstrukten erlauben die ektopische Expression von verschiedenen Blow-Varianten

Dem Blow-Protein konnte bisher noch keine molekulare Funktion zugeordnet werden. Um dem Verständnis der molekularen Funktion des Proteins näherzukommen, wurden verschiedene Varianten des Blow-Proteins durch das UAS-Gal4-System im *Drosophila*-Embryo exprimiert (Brand und Perrimon, 1993). Dazu mussten die cDNAs der verschiedenen Blow-Varianten in den pUAST-Vektor eingebracht werden. Der pUAST-Vektor trägt fünf optimierte UAS-Bindestellen, die von Gal4-Proteinen gebunden wer-

den können, eine *hsp70* TATA-Box, eine SV40-3'UTR und eine Polyadenylierungsstelle. Im Anschluss an die *hsp70* TATA-Box findet sich eine 'Multiple Cloning Site', in die die kodierenden Sequenzen eingebracht werden können.

Der pUAST-Vektor wird zusammen mit einem Transposase-kodierenden Helferplasmid mittels Mikroinjektion in *white*⁻-Embryonen eingebracht (siehe 4.2.3).

5.5.1 Die Generierung verschiedener UAS-*blow*-Konstrukte

Obwohl die Bedeutung von *blow* für die Myoblastenfusion in *Drosophila* schon lange bekannt ist (Doberstein et al., 1997), existierten lange keine cDNAs des Gens. Durch PCRs an der embryonalen LD cDNA-Bank (Stapleton et al., 2003) ist es zunächst gelungen, ein Fragment des Gens zu isolieren (Diplomarbeit F. Kurtz, 2003). Dieses Fragment, *Blow*ΔN-113, startet mit dem ATG 336 bp nach dem wildtypischen ATG und ist somit um 112 Aminosäuren verkürzt. Da es lange Zeit nur diese cDNA von *blow* gab, wurde mit ihr weitergearbeitet. Um zu überprüfen, ob die N-terminale Deletion die Funktion des Proteins stört, wurde *Blow*ΔN-113 in pUAST kloniert und in Fliegen injiziert (R.H. Schröter, unveröffentlicht). Die weiterführende Analyse war Teil der vorliegenden Arbeit und wird in Abschnitt 5.6.1 gezeigt.

Später konnte – ebenfalls durch PCRs an der LD cDNA-Bank – die vollständige cDNA von *blow* generiert werden (*blow*FL, Kesper et al., 2007). Diese cDNA wurde als Ausgangsmaterial für spätere Analysen verwendet.

Wie die *in silico*-Analyse in 5.3.2 ergab, beinhaltet *Blow* neben der PH-Domäne ein Tyrosin, für das eine funktionelle Bedeutung besonders wichtig erscheint: Tyrosin 342 scheint phosphoryliert zu werden und ist zentraler Teil eines Bindemotivs für klassische SH2-Domänen und verschiedene Kinasen. Daher steht diese Aminosäure neben der PH-Domäne im Zentrum des Interesses.

Für die Generierung von pUAST-Konstrukten wurde zum einen das Tyrosin 342 in *blow*ΔN-113 zu Histidin mutiert, um in späteren Experimenten zu überprüfen, ob dieses Tyrosin für die Funktion bzw. die Lokalisierung des *Blow*-Proteins vonnöten ist (*blow*ΔN-113-Y342H, Klonierung: R. Schröter, Fliegenarbeit: diese Dissertation). Eine phosphomimetische Mutation des gleichen Tyrosins tauscht das Tyrosin gegen ein Aspartat und sorgt mit der zweiten Carboxylgruppe des Aspartats für eine negative Ladung, die die Ladung einer Phosphorylierung nachahmen kann (*Blow*FL-Y342D; Lee et al., 2007; Kahali et al., 2009). *Blow*FL-Y342D soll also eine putativ aktivierte Form von *Blow* darstellen.

Ein Konstrukt mit einer Deletion der PH-Domäne (Blow Δ PH) bzw. die Isolation der PH-Domäne (Blow-PH, Klonierung: M. v.Rüden, BSc 2009) soll klären, ob die PH-Domäne für die Funktion oder Lokalisation des Proteins notwendig ist. Die Konstrukte BlowFL-Y342D, Blow Δ PH und Blow-PH tragen einen HA-Tag vor dem Stop-Codon.

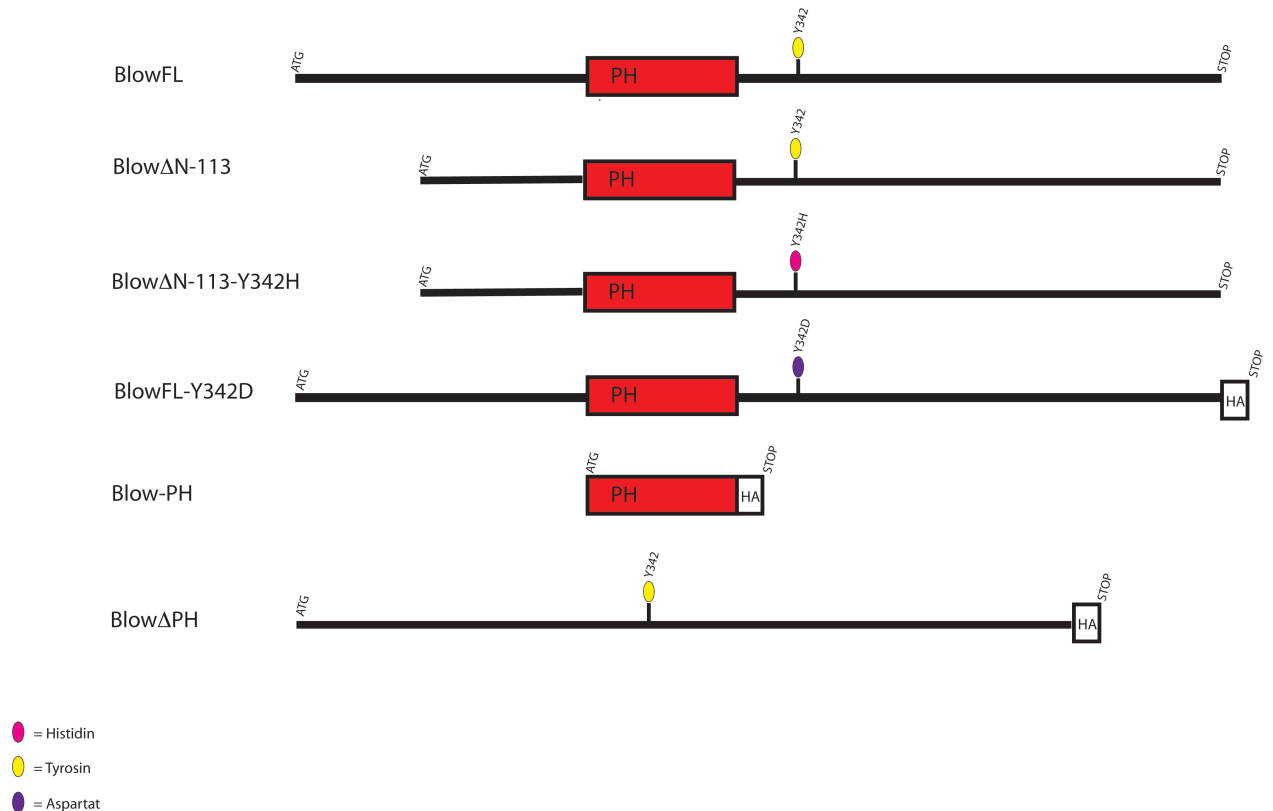


Abbildung 5.5: Verschiedene Varianten von UAS-*blow*-Konstrukten. Durch verschiedene Strategien wurden unterschiedliche Varianten des Blow-Proteins geschaffen. Dabei entspricht BlowFL dem wildtypischen 'Fulllength-Protein' von Blow. Blow Δ N-113 entspricht einer verkürzten Version von Blow, dem 112 Aminosäuren des N-Terminus fehlen. Blow Δ N-113-Y342H entspricht Blow Δ N-113 mit einem Aminosäure-Austausch von Tyrosin 342 zu Histidin. BlowFL-Y342D ist BlowFL mit einem Austausch von Tyrosin 342 zu Aspartat. Blow-PH umfasst nur die PH-Domäne von Blow, versehen mit einem Start und 'Stop-Codon' in Frame sowie einem HA-Tag vor dem 'Stop-Codon'. Bei Blow Δ PH wurde die PH-Domäne deletiert.

5.5.2 Die ektopisch exprimierten Proteine können immunhistologisch nachgewiesen werden

Um zu überprüfen, ob die klonierten UAS-*blow*-Konstrukte in der Fliege funktional sind und nach Kreuzung mit Gal4-Treiberstämmen zur Expression von nachweisbaren Mengen von Protein führen, wurde jede verwendete Fliegenlinie mit dem *wg*-Gal4 Trei-

berstamm gekreuzt. Die resultierenden Embryonen wurden mit anti-Blow-Antikörper analysiert, so dass eine Blow-Detektion im *wg*-Expressionsmuster die Funktionalität der Linie beweist.

Für die Linien UAS-*blowFL*, UAS-*blowΔN-113*, UAS-*blowΔN-113-Y342H*, UAS-*blowFL-Y342D* und UAS-*blowΔPH* konnte dieser Nachweis erfolgreich geführt werden; das Streifenmuster der *wg*-Expression ist in der anti-Blow-Färbung zu erkennen (Abb. 5.6 A – E, Pfeile).

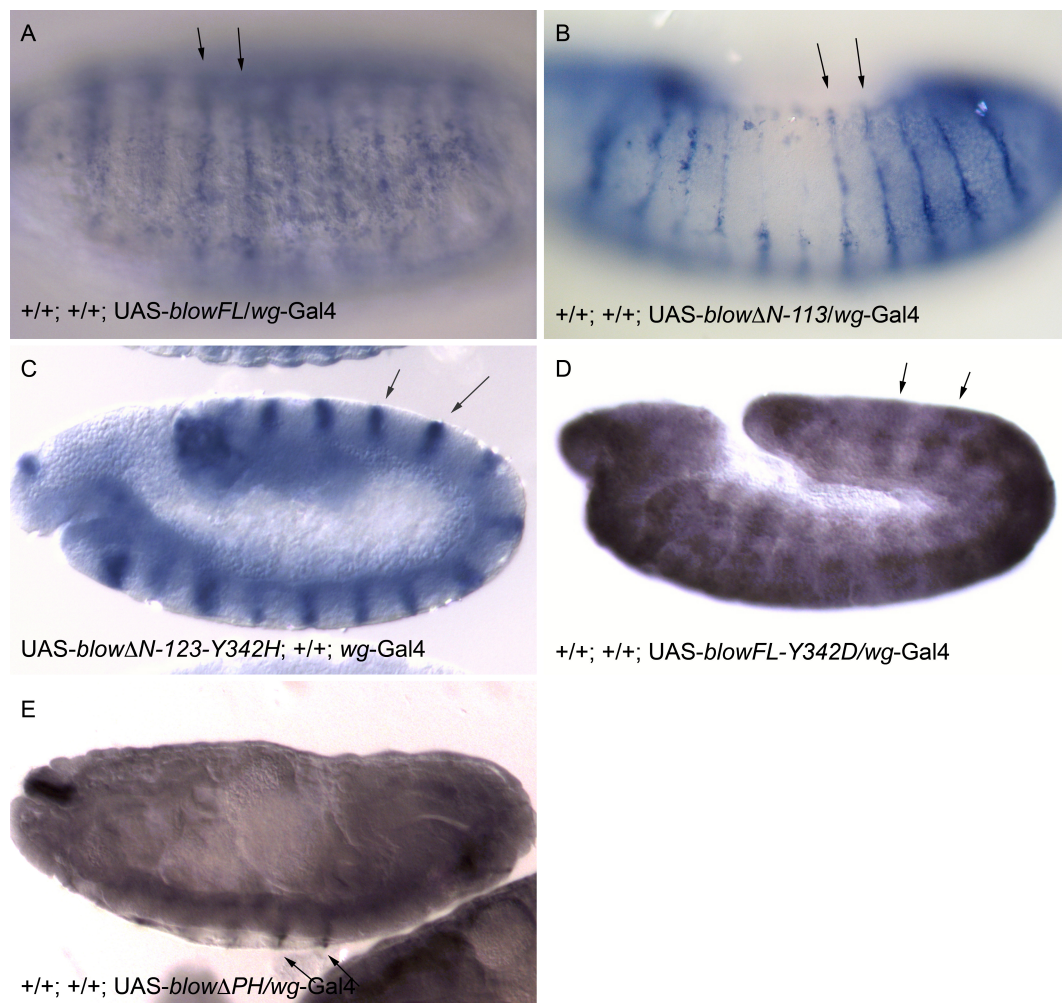


Abbildung 5.6: Nachweise der durch das UAS-Gal4-System exprimierten Blow-Versionen. Gezeigt sind anti-Blow-Antikörperfärbungen an Embryonen, die die UAS-Konstrukte mittels des *wg*-Gal4-Treiberstammes exprimieren. (A) *blowFL* (B) *blowΔN-113* (C) *blowΔN-113-Y342H* (D) *blowFL-Y342D*. (E) *blowΔPH*. Die Pfeile weisen auf das Streifenmuster einer *wg*-Expression.

5.5.3 Die *wg*-Gal4 vermittelte Expression von UAS-*blow-PH* führt zu keinem nachweisbaren Protein

Da der anti-Blow-Antikörper gegen den N-Terminus des Proteins gerichtet ist und somit nicht die PH-Domäne von Blow detektieren kann, musste zum Nachweis dieser Expression eine andere Strategie gewählt werden. Da Blow-PH ein HA-Epitop vor dem Stop-Codon trägt, sollte eine anti-HA-Färbung Blow-PH in UAS-*blow-PH*/*wg*-Gal4-Embryonen nachweisen.

Leider war Blow-PH in allen Kreuzungen der drei etablierten UAS-*blow-PH* Linien nicht detektierbar (nicht gezeigt).

5.5.4 Unterschiedliche Gal4-Treiberstämme ermöglichen eine Expression der Blow-Varianten in verschiedenen Expressionsmustern

Ein Vorteil des UAS-Gal4-Systems ist, dass UAS-Konstrukte in verschiedenen Geweben spezifisch und ektopisch exprimiert werden können. Dazu werden Treiberstämme verwendet, die die kodierende Sequenz von Gal4 hinter den Promotoren verschiedener Gene tragen. Daher unterscheidet sich das Expressionsmuster und die Expressionsstärke der verschiedenen Treiberstämme je nach verwendetem Promotor. Für die Untersuchungen der Myoblastenfusion bieten sich verschiedene Treiber an: TGX (ein *twist*-Gal4 Treiber auf dem X-Chromosom lokalisiert) ist ein Treiber, der UAS-Konstrukte – der *twist*-Expression entsprechend – in FCMs und in FCs/Precursorzellen treiben kann. Wie in Abbildung 5.7A zu sehen, handelt es sich bei dem TGX-Treiber um einen sehr starken Treiber. Die *sns*-Treiberlinie kann nur Expressionen in den FCMs vermitteln und ist deutlich schwächer, d. h. das Expressionsniveau der UAS-Konstrukte liegt unter dem des TGX-Treibers (Abb. 5.7B). Die *rols*-Gal4-Fliegenlinie kann schließlich für eine Expression in FCs/Precursorzellen verwendet werden (Abb. 5.7C).

Das bedeutet, dass nur der *sns*-Treiber für eine wildtyp-ähnliche Expression von Blow verwendet werden kann, da Blow nur in den FCMs exprimiert wird (Schröter et al., 2006). Eine Verwendung von TGX beinhaltet immer auch eine Expression der Konstrukte in den FCs/Precursorzellen, während der *rols*-Gal4-Fliegenstamm für eine ausschließlich ektopische Expression von Blow-Konstrukten in FCs/Precursorzellen verwendet werden kann.

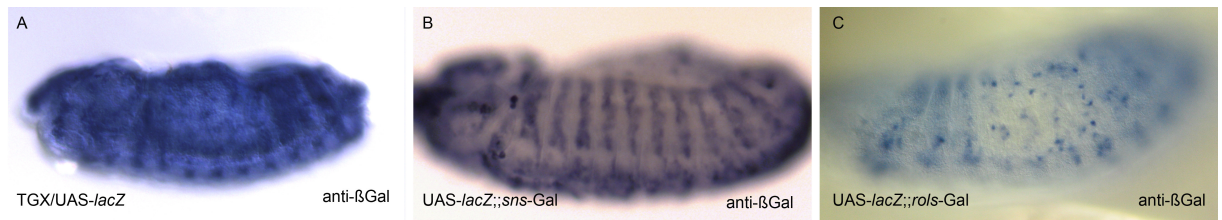


Abbildung 5.7: Die Expressionsmuster von verschiedenen Gal4-Treiberlinien. Verschiedene Gal4-Treiberlinien wurden gegen einen UAS-*lacZ* Stamm gekreuzt. Die resultierenden Embryonen wurden mit einem anti- β -Galaktosidase-Antikörper gefärbt. (A) Der auf dem X-Chromosom lokalisierte *twist*-Gal4-Treiber (TGX) zeigt eine starke LacZ-Expression in den FCs und FCMs. (B) Der *sns*-Gal4-Treiber kann UAS-Konstrukte nur in den FCMs treiben. (C) Der *rols*-Gal4-Treiber zeigt eine LacZ-Expression in den FCs.

5.5.5 Die ektopische Expression der Blow-Varianten stört die Entwicklung der embryonalen Muskulatur nicht

Um zu überprüfen, ob eine ektopische Expression der Blow-Varianten in den FCs/Precursorzellen die Entwicklung stört, wurden die UAS-Blow-Konstrukte mittels des *rols*-Gal4-Treibers exprimiert. Eine anti- β 3-Tubulin-Färbung wurde zur Sichtbarmachung der Muskulatur durchgeführt. Abbildung 5.8 zeigt für das wildtypische BlowFL sowie für Blow Δ N-113, Blow Δ N-113-Y342H, Blow Δ PH und Blow Δ N-113-Y342D, dass eine ektopische Expression nicht stört. Die Embryonen sehen trotz der Existenz der Blow-Versionen in den FCs/Precursorzellen wildtypisch aus und zeigen vollständige Muskeln. Es gibt keine Anzeichen für eine gestörte Myoblastenfusion.

Daher gilt, dass für Rettungsexperimente mit Blow-Konstrukten sowohl der *sns*-Gal4-Treiberstamm als auch der *twist*-Gal4-Treiberstamm verwendet werden kann, da eine ektopische Expression des Proteins die Myoblastenfusion nicht stört. Dabei sollte bedacht werden, dass die durch den *twist*-Gal4-Treiber vermittelte Expression deutlich stärker ist als die Expression, die durch *sns*-Gal4 oder *rols*-Gal4 hervorgerufen werden können.

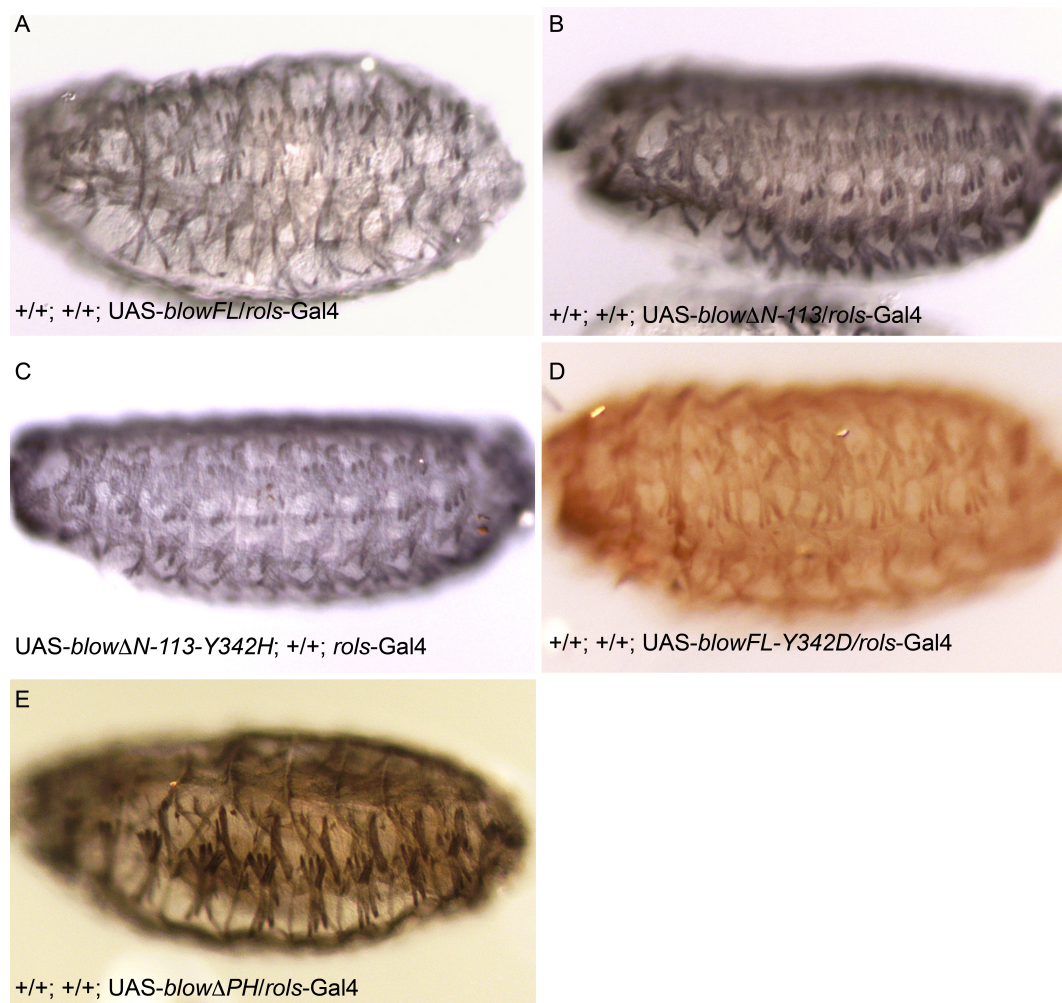


Abbildung 5.8: Ektopische Expression verschiedener Blow-Versionen in den Founderzellen. Anti- β 3-Tubulin-Färbungen an Embryonen, in denen eine Expression verschiedener UAS-Konstrukte mittels des *rols*-Gal4-Treiberstammes in den FC/Precursorzellen vermittelt wurde. (A) UAS-*blowFL* (B) UAS-*blowΔN-113* (C) UAS-*blowΔN-113-Y342H* (D) UAS-*blowFL-Y342D* (E) UAS-*blowΔPH*. Die Embryonen zeigen ein wildtypisches Muskelmuster; die Myoblastenfusion ist nicht gestört.

5.6 Rettungsexperimente des *blow*²-Phänotyps mit verschiedenen Blow-Varianten

5.6.1 UAS-*blowFL* und UAS-*blowΔN-113* retten den *blow*²-Phänotyp nicht

Um zu zeigen, dass eine Expression des wildtypischen *blowFL*-Konstruktes sowie des *blowΔN-113*-Konstruktes in *blow*² fähig ist, den mutanten Phänotyp zu retten, wurden beide UAS-Konstrukte in den *blow*²-Hintergrund eingekreuzt und mit dem *twist*- bzw. *sns*-Gal4-Treiber getrieben. Die Embryonen sind in Abbildung 5.9 gezeigt. Über-

raschenderweise zeigen alle Embryonen weiterhin den *blow*²-mutanten Phänotyp (vergleiche Abb. 5.1). Während in Abbildung 5.9B und C jüngere Embryonen gezeigt sind, bei denen sich noch klar der 'bunch-of-grapes'-Phänotyp erkennen lässt, sind in den Abbildungen A und D ältere Tiere dargestellt, die das stark ungeordnete Muskelmuster mit den extrem verdünnten Myotuben zeigen. Eine Rettung ist in keinem Fall zu erkennen. Dabei sind auch keine Unterschiede zwischen der starken Expression mit dem *twist*-Gal4-Treiber und der schwächeren Expression mit dem *sns*-Gal4-Treiberstamm oder zwischen UAS-*blowFL* und UAS-*blowΔN-113* zu erkennen.

Rettungsversuche durch eine Expression von *blowΔN-113-Y342H*, *blowΔPH* und *blowFL-Y342D*, die die putative Phosphorylierung und deren Relevanz für die Funktion des Proteins sowie die Relevanz der PH-Domäne beweisen könnten, wurden an diese Experimente nicht mehr angeschlossen, da die wildtypischen Konstrukte nicht zu einer Rettung führten. Auch ein *in vitro*-Assay, bei dem die Phosphorylierung an *in vitro* transkribierten/translatierten Proteinen gezeigt werden sollte, konnte keinen Aufschluss darüber geben, ob Blow tatsächlich phosphoryliert wird, wie vorhergesagt wurde (nicht gezeigt).

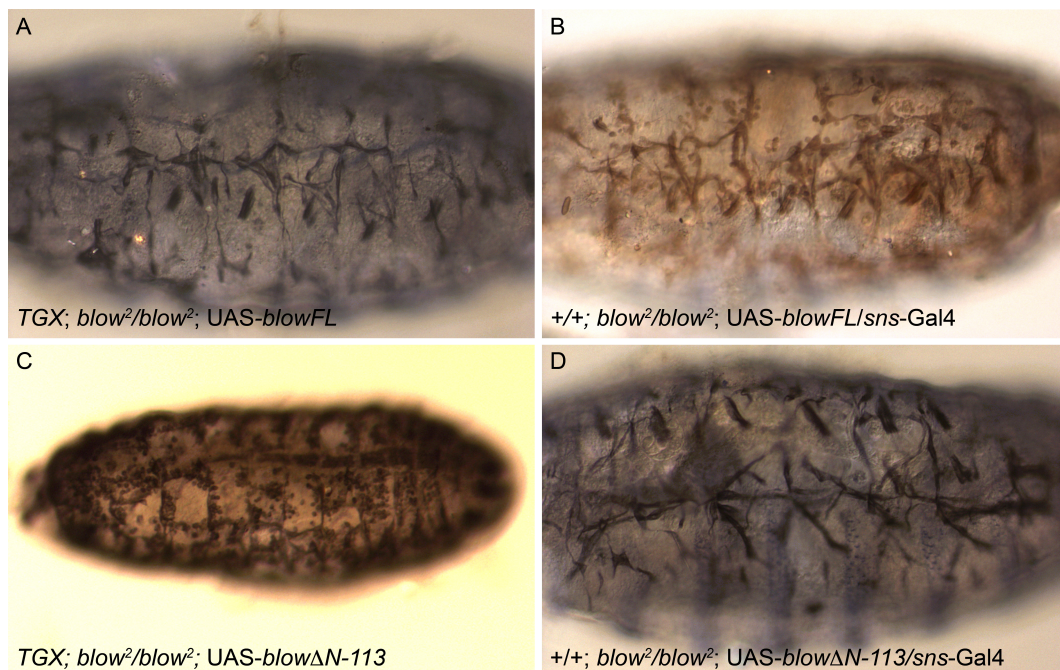


Abbildung 5.9: Rettungsexperimente mit UAS-*blowFL* und UAS-*blowΔN-113*. Anti-β3-Tubulin-, anti-β-Galaktosidase-Färbungen an *blow*²-Embryonen in denen mittels des UAS-Gal4-Systems entweder UAS-*blowFL* (A und B) oder UAS-*blowΔN-113* (C und D) getrieben wurde. Dazu wurden die Treiber TGX (*twist*-Gal4, A und C) sowie *sns*-Gal4 (B und D) verwendet. Der Phänotyp ähnelt sehr stark dem der *blow*²-Embryonen.

Eine Möglichkeit, warum das Rettungsexperiment von *blow*² nicht funktioniert haben könnte ist, dass das Expressionsniveau von Blow genau reguliert ist und z.B. eine höhere Menge von Blow die Fusionen stört. Wenn eine Überdosis von Blow tatsächlich in der Entwicklung stört, sollte sich bei einer zelltypspezifischen Proteinexpression in wildtypischem Hintergrund ebenfalls ein Defekt in der Myoblastenfusion zeigen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde BlowFL sowie BlowΔN-113 mittels des *sns*-Gal4-Treiberstammes in den FCMs exprimiert. Wie in Abbildung 5.10 zu sehen, zeigen die Embryonen trotz der Überexpression keine Unregelmäßigkeiten in der Muskelentwicklung. Die Myotuben sind ordnungsgemäß fusioniert.

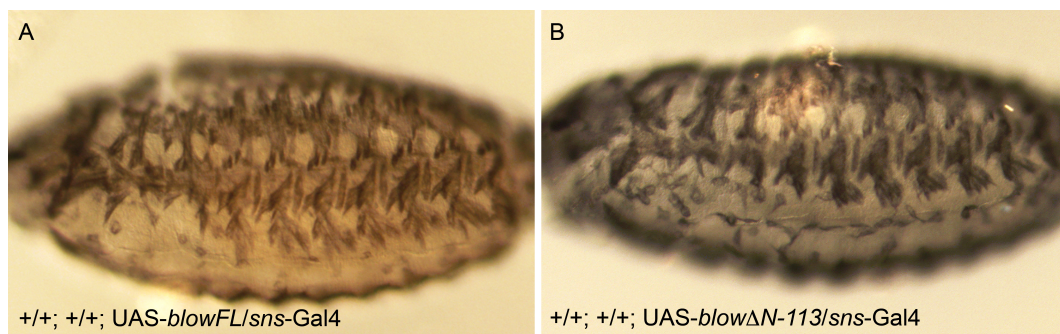


Abbildung 5.10: ektopische Expressionen von UAS-*blowFL* und UAS-*blowΔN-113* im wildtypischen Hintergrund. Anti-β3-Tubulin Färbungen machen das Muskelmuster sichtbar. (A) Expression von *blowFL*. (B) Expression von *blowΔN-113*. Die Embryonen zeigen keine Auffälligkeiten.

5.6.2 Die putative Spleißvariante *blow-C* wird im Embryo nicht transkribiert

Am 16. Oktober 2009 wurde auf FlyBase, der Internet-Datenbank für *Drosophila* Gene, postuliert (Tweedie et al., 2009), dass neben der bekannten Spleißform Blow-A, die auch in Abb. 5.2 dargestellt ist, eine weitere Spleißvariante, Blow-C, existiert. Da die Rettungsexperimente (Abb. 5.9) erstaunlicherweise auch mit wildtypischem BlowFL und verschiedenen Treiberstämmen nicht funktioniert haben, stellte das potentielle Auftreten einer zweiten Spleißvariante eine Erklärungsmöglichkeit dar: Sollten statt nur einer Spleißvariante zwei Spleißvarianten in dem Embryo exprimiert werden, könnte es sein, dass eine Rettung mit nur einem getriebenen Konstrukt nicht ausreicht, um den mutanten Phänotyp aufzuheben. Blow-C würde konditional über eine sehr viel längere 5'UTR, ein N-terminal verkürztes Protein und eine verkürzte 3'UTR verfügen. Interessanterweise entspricht Blow-C exakt BlowΔN-113, was bedeutet dass Blow-C um 112 Aminosäuren N-terminal verkürzt wäre.

Um die Frage zu klären, ob tatsächlich zwei Spleißvarianten von *Blow* im Embryo exprimiert werden, wurden RT-PCRs an embryonaler mRNA durchgeführt (Abb. 5.11). Dabei wurde jeweils ein Primer eingesetzt, der in dem dritten Exon des Gens liegt (Primer B in Abb. 5.11A). Zum Nachweis von *blow-A* mRNA wurde neben Primer B noch Primer A eingesetzt, der am Anfang des zweiten Exons liegt. Zum Nachweis der neuen Spleißvariante *blow-C* wurde der Primer C verwendet, der in dem neu postulierten, verlängerten Bereich der 5'UTR liegt und somit in *blow-A* weggespleißt sein sollte (Abb. 5.11A). Die Funktionalität der Primer konnte durch PCRs an genomischer DNA sicher gestellt werden (nicht gezeigt).

Wie in Abbildung 5.11B (Spur A) zu sehen, konnte nur die Existenz von *blow-A* bewiesen werden. Die Größe des RT-PCR Produkts entspricht in etwa den Erwartungen von 743 bp. Wenn darüber hinaus tatsächlich die lange Form der 5'UTR in den Fliegen exprimiert worden wäre, hätte Primer C daran binden können, da UTRs beim Spleißen nicht entfernt werden. Es wäre ein PCR-Produkt von 901 bp zu erwarten gewesen (Abb. 5.11B, Spur C). Da die RT-PCR kein Produkt für *blow-C* produzieren konnte, scheint die Existenz von *Blow-C* im Embryo unwahrscheinlich.

Damit gibt es keinen Hinweis mehr darauf, dass die Rettungsexperimente aus 5.6.1 an der Existenz verschiedener Spleißvarianten von *blow* gescheitert sind.

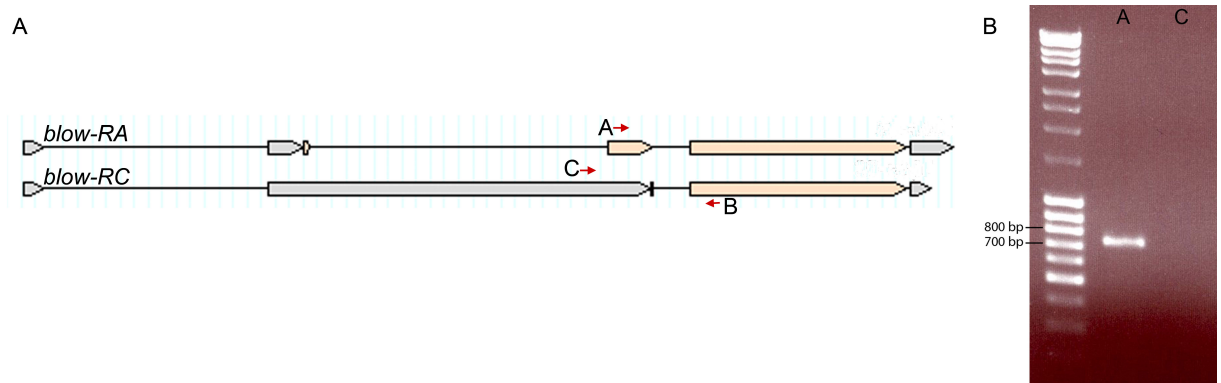


Abbildung 5.11: Die von FlyBase vorhergesagten Spleißvarianten von *blow*. (A) *blow-RA* stellt die bekannte und nachgewiesene Spleißvariante von *blow* dar, bei der die 5'UTR 360 bp und der ORF 1935 bp umfasst. *blow-RC* entspricht der neu postulierten Spleißvariante mit 2855 bp 5'UTR und nur 1599 bp ORF. *Blow-C* entspricht *Blow*ΔN-113. Die Pfeile entsprechen den Primern, die für die RT-PCRs an embryonaler mRNA verwendet wurden. Der Primer B wurde in beiden Reaktionen verwendet, während Primer A nur für die RT-PCR zum Nachweis von Spleißvariante A und Primer C nur für den Nachweis von Spleißvariante C verwendet wurde. Die UTRs sind in grau dargestellt, während die kodierenden Region orange gefärbt sind. (B) Gelbild der RT-PCRs an Embryonen mRNA. Die RT-PCRs können Spleißvariante A nachweisen, während Spleißvariante C nicht nachweisbar bleibt (vergleiche Spur A und C).

5.7 Das Blow-Protein lokalisiert in verschiedenen Mutanten noch in den FuRMAS

Um zu überprüfen, ob Blow in verschiedenen mutanten Situationen immer noch an den Zellkontakten der FCMs lokalisiert, wie es für den Wildtyp nach Zell-Zell-Adhäsionen beschrieben wurde (Kesper et al. 2007), wurde in dieser Arbeit die Blow-Lokalisation in verschiedenen Fusionsmutanten betrachtet. Dazu wurden anti-Blow-Färbungen ausgewertet. Eine Anhäufung von Blow in Membrannähe bedeutet dabei nach Kesper et al. (2007) eine Ausbildung der FuRMAS-Struktur, in deren Innerem Blow zu dem Aktin-Zentrum lokalisiert.

5.7.1 Zell-Zell-Adhäsionen sind essentiell für die Blow-Lokalisationen an die Membran

In Embryonen, die eine Defizienz der Adhäsionsproteine Duf und Rst tragen (5.12C und C'), ist die Anzahl der membrannahen Blow-Akkumulationen stark reduziert. Allerdings finden sich auch in diesen Embryonen, in denen keinerlei gezielte Adhäsionen zwischen FCs und FCMs mehr stattfinden können (Ruiz-Gomez et al., 2000), vereinzelte Fälle von Blow-Lokalisierungen an den Zellkontakten (5.12C', Pfeil), obwohl postuliert wurde, dass Blow erst nach der Zelladhäsion lokalisiert wird (Kesper et al., 2007). Da die Anzahl der Blow-Lokalisierungen im Vergleich zu wildtypischen Embryonen reduziert ist, ist es denkbar, dass Blow in *duf*, *rst*-Mutanten nur dann an der Membran lokalisiert, wenn die Myoblasten zufällig Kontakt zueinander haben. Eine Blow-Lokalisation ohne Zell-Zell-Adhäsion scheint nicht aufzutreten (für eine Beschreibung der Mutationen siehe 4.1.9).

Auf Seite der FCMs ist Sns das kontaktvermittelnde Adhäsionsmolekül. Auch in den *sns*²⁰⁻²³-Mutanten kommt es zu keiner Adhäsion der beiden Zelltypen, obwohl kürzlich gezeigt werden konnte, dass das Protein Hibris bei Überexpression partiell redundant zu Sns wirken kann, so dass einzelne Fusionen auftreten (Shelton et al., 2009). In den mutanten Embryonen werden – ähnlich wie in der *duf*, *rst*-Defizienz – zwar Blow-Akkumulationen an den Zellkontakten gefunden; diese sind aber seltener als im Wildtyp (Abb. 5.12D im Vergleich zu 5.12A). Wie in Abbildung 5.12D' zu sehen, kommt es auch zu einer Akkumulation, wenn die FCM nicht an eine andere Myotube, sondern an die Epidermis anlagert.

Eine ähnliche Beobachtung wie in der *duf*, *rst*-Defizienz und der *snr²⁰⁻²³*-Mutante konnte für die Mutanten der Gens *myoblast city* (*mbc*) gemacht werden. *mbc^{C1}*-mutante Embryonen zeigen in 80 % der Fälle Defekte im dorsalen Rückenschluss und weisen überhaupt keine Myoblastenfusionen im somatischen Mesoderm mehr auf, d.h. auch die Precursorzellen werden nicht mehr ausgebildet (Erickson et al., 1997). Daher ist eine Akkumulation des Blow-Proteins nur in wenigen Fällen zu beobachten (Abb. 5.12 E). Auch hier ist es möglich, dass eine Anhäufung des Blow-Proteins nur dann stattfindet, wenn es zu einem zufälligen Kontakt zwischen den Myoblasten kommt. In diesem Phänotyp ähneln die Embryonen den *duf*, *rst*-Mutanten.

Ähnlich wie in den vorhergehenden Mutanten zeigen auch *lame duck^{E202}*-Mutanten keine fusionierten Myoblasten im somatischen Mesoderm (*lmd*, Abb. 5.12B; Duan et al., 2001). Aber wie in den beiden zuvor beschriebenen Mutanten wird auch hier Blow zu dem Zellkontakt rekrutiert, wenn ein Kontakt von zwei Myoblasten zustande gekommen ist (Abb. 5.12B'). Das Allel *lmd^{E202}* ist molekular noch nicht charakterisiert worden; es könnte sich also um ein hypomorphes Allel handeln.

kette^{J4-48}-Embryonen entwickeln sich – ähnlich wie *blow²*-Tiere – bis zum Precursorzellstadium; bilden also noch zwei- bis dreikernige Zellen aus. Rettungsexperimente von *blow²*-Embryonen durch Kette-Expression haben zeigen können, dass *kette* in der Entwicklung nach *blow* agiert (Schröter et al. 2004). Daher verwundert es nicht, dass die anti-Blow-Färbung an *kette*-Embryonen zeigt, dass Blow noch an die Zellkontakte lokalisiert (5.12F und F'). Die Lokalisation von Blow scheint abgeschlossen zu sein, bevor die Entwicklung von *kette* stoppt; die Blow-Verteilung ist wildtypisch.

In Abbildung 5.12G und G' ist die Blow-Lokalisierung in *arp3^{gchwächling}*-Embryonen gezeigt. Diese Embryonen zeichnen sich dadurch aus, dass sie einen Teil der Fusionen durchführen können und Precursorzellen ausbilden (Berger et al., 2008). Dies liegt u.a. daran, dass Arp3 über eine starke maternale Komponente verfügt und somit auch zygotische Null-Mutanten immer noch über einen Teil der Proteine verfügen (Berger et al., 2008). Diese Mutanten zeigen vereinzelt eine wildtypische Blow-Akkumulation in Membrannähe (5.12G und G'). Ob diese Beobachtung darauf zurückzuführen ist, dass in *arp3^{gchwächling}*-Mutanten wegen ihrer maternalen Komponente noch weiter Fusionen stattfinden, bleibt zu untersuchen. Präliminäre Analysen ließen außerdem den Eindruck entstehen, dass in *arp3^{gchwächling}*-Embryonen das Blow-Proteinniveau reduziert ist und die Lokalisationen von Blow weniger oft auftreten als die Anzahl an Zell-Zell-Adhäsionen zuliesse. Diese Beobachtung sollte mit weiteren Färbungen bestätigt werden.

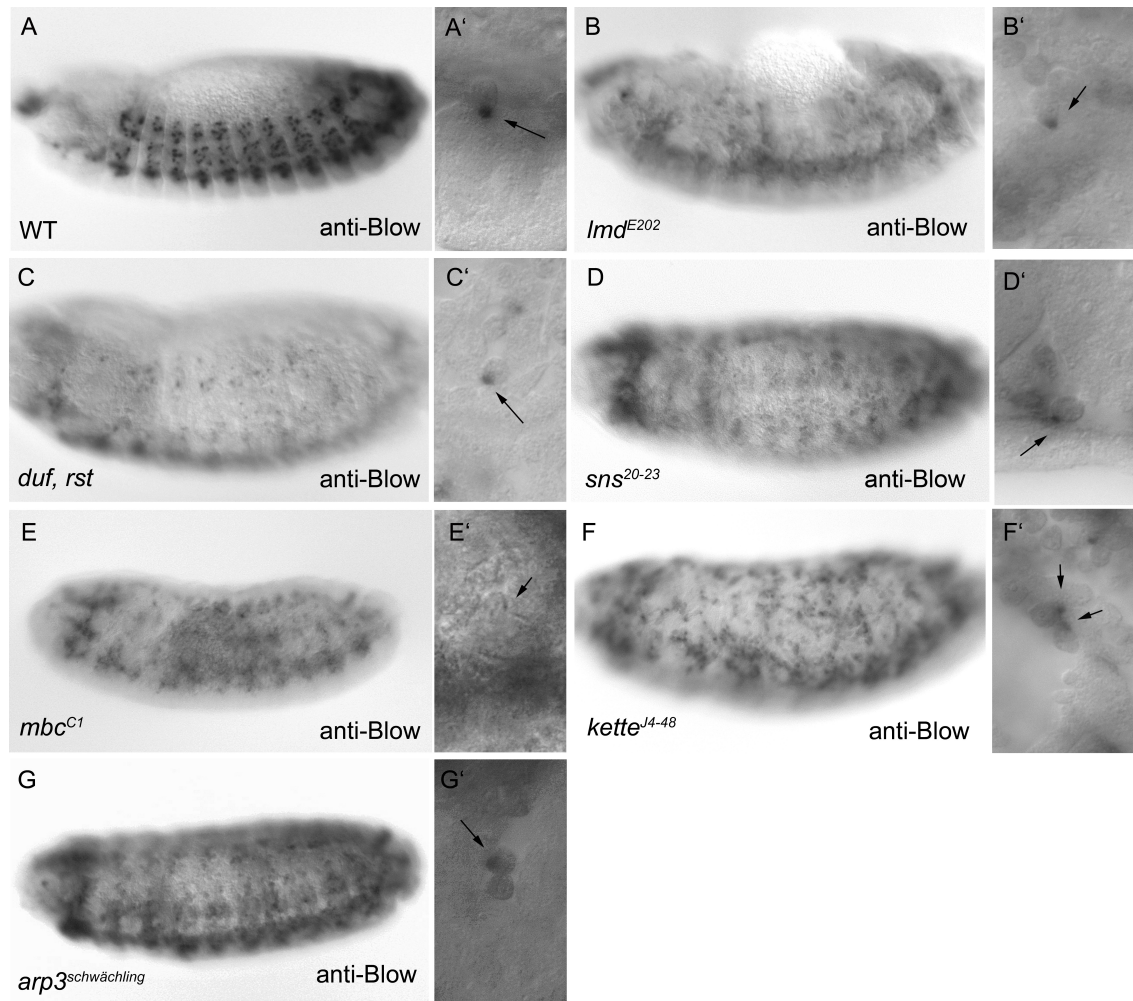


Abbildung 5.12: Die Blow-Verteilung in verschiedenen fusionsmutanten Embryonen. Gezeigt sind anti-Blow-Färbungen an verschiedenen homozygoten Mutanten: (A) wildtypischer Embryo zum Vergleich. (B) *lmd*^{E202}. (C) Defizienz von *duf* und *rst*. (D) *sns*²⁰⁻²³. (E) *mbc*^{C1}. (F) *kette*^{J4-48}. (G) *arp3*^{schwächling}. Die Bilder A', B', C', D', E', F' und G' stellen Detailvergrößerungen des jeweiligen Embryos dar. Die Pfeile deuten auf die Akkumulationen von Blow an den Zell-Zell-Kontakten.

5.8 Die evolutionäre Konservierung von *blow*

5.8.1 Diverse *Drosophila*-Spezies weisen Orthologe zu *blown fuse* auf

Da der starke Phänotyp von *blow*-mutanten Embryonen zeigt, dass Blow eine essentielle Funktion in der Myoblastenfusion von *Drosophila melanogaster* zukommt, scheint es wahrscheinlich, dass Orthologe mit ähnlichen Funktionen auch in anderen *Drosophila*-Spezies vorkommen. Um diese Orthologe zu finden wurde ein heuristischer Datenbankvergleich mit der Aminosäure-Sequenz von Blow durchgeführt (Basic Local Alignment Tool (Blast, Altschul et al., 1990)). Da in den vergangenen Jahren viele *Drosophila*-Genome sequenziert und der Forschungsgemeinschaft zugänglich gemacht worden sind, hat eine Analyse ein umfassendes Bild schaffen können.

In dem Alignment von *blown fuse* mit Orthologen anderer *Drosophila*-Spezies wurden ausschließlich Proteine miteinbezogen, deren E-value mit 0.0 angegeben wurde (siehe Anhang, Abb. 9.7). Da der E-value die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der die eingesetzte Sequenz zufällig mit der Ergebnis-Sequenz übereinstimmt, kann bei einem E-value von 0.0 davon ausgegangen werden, dass eine signifikante Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen vorliegt. Über diese Proteine hinaus wurde ein weiteres Protein der Art *D. willistoni* gefunden, XM_002060965, das einen E-value von $3e^{-179}$ hat. Dieses Protein weist also unter höchster Wahrscheinlichkeit auch signifikante Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz auf.

Bei genauerer Analyse des Alignments fällt auf, dass *blow* mit den Arten *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba* und *D. erecta* besonders stark konserviert ist. Das entspricht den Erwartungen, da diese Arten besonders nah mit *D. melanogaster* verwandt sind, während *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. mojavensis*, *D. virilis* und *D. grimshawi* evolutionär weiter von *D. melanogaster* entfernt sind (FlyBase). Etwas überraschend ist, dass das *blow*-Ortholog von *D. willistoni* nach BLAST weniger konserviert ist als die Orthologe von *D. mojavensis*, *D. virilis* und *D. grimshawi*, obwohl *D. willistoni* näher mit *D. melanogaster* verwandt ist. Allerdings weist auch das *D. willistoni*-Ortholog mit $3e^{-179}$ eine sehr hohe Ähnlichkeit zu Blow auf.

Keines der Orthologe von Blow wurde bislang in irgendeiner Weise analysiert und daher können auch keine Aussagen über Expressionsmuster, Funktionen oder mutante Phänotypen der Proteine getroffen werden. Allerdings fällt auf, dass sowohl die PH-Domäne als auch die beiden putativen SH3-Bindestellen für Src-SH3 (mit dem 'Medium Stringency'-Modus detektiert) und Crk-SH3 (auch mit dem 'High Stringency'-Modus

detektiert) sowie das putative Phosphorylierungs- und Bindemotiv um Y342 konserviert ist (Abb. 9.7, Anhang). Da eine hohe Konservierung in Regionen mit funktionaler Bedeutung auftritt, ist dies ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit der *in silico*-Befunde (siehe 5.3). Für eine beispielhafte Analyse der Phosphorylierungsstellen wurde das Blow-Ortholog von *D. grimshawi* ausgewählt, da diese Art evolutionär vergleichsweise weit entfernt von *D. melanogaster* ist. Erneut wurde der NetPhos 2.0-Server (Blom et al., 1999) verwendet. Wie in Tabelle 5.6 zu sehen ist, gibt es mehrere putative Phosphorylierungsstellen, die zwischen den beiden Arten konserviert sind (Tab. 5.6, fett gedruckt) und damit eine Phosphorylierung *in vivo* besonders nahe legen.

Aminosäure	Anzahl	Position
Serin	43	11, 27, 31 , 112, 113 , 114, 115, 116, 142, 143, 144 , 147, 149, 151 , (262, 266, 267, 274), 349, 359, 365 , 385, 406, 412, 474, 485, 487, 491, 517, 523 , 529, 547, 548, 552, 555, 558, 569, 600, 608, 611, 627, 631, 645
Threonin	11	29, 91, (224), 332, 335 , 344, 436, 473, 507, 527, 556
Tyrosin	11	33 , 130, 154, 210, (226, 256, 270, 304), 350, 361 , 395

Tabelle 5.6: putative Phosphorylierungsstellen in dem Blow-Ortholog von *D. grimshawi*. Angezeigt werden nur die durch NetPhos 2.0 mit einer Wahrscheinlichkeit von über 50 % angegebenen Phosphorylierungsstellen. Die fettgedruckten Zahlen geben Phosphorylierungsstellen an, die konserviert im Blow-Protein vorliegen. Die in Klammern angegebenen Stellen liegen in der PH-Domäne. Tyrosin 361 entspricht dem Tyrosin 342 aus Blow (9.7).

5.8.2 Ist Blow ein Ortholog von Skap2?

In der Dissertation von R.H. Schröter 2006 wurden die Zebrafisch-Proteine Skap1/Skap55 und sein Paralog Skap2/Skap55-R/Skap-Hom als Orthologe von Blown fuse postuliert. Diese Proteine sind vermutlich am Aufbau der immunologischen Synapse beteiligt (siehe 2.3.1) und lokalisieren dort im Aktin-reichen Zentrum, ähnlich wie Blow mit dem Aktin der FuRMAS kolokalisiert. Anders als bei Blow finden sich neben einer PH-Domäne in beiden Proteinen C-terminal eine SH3-Domäne (Übersichtsartikel Wang und Rudd, 2008). Die Skap-Proteine sind in Vertebraten sehr gut konserviert (Abb. 9.9, Anhang). Die Proteine sind daher von besonderem Interesse, da schon eine strukturelle Homologie von FuRMAS und immunologischen Synapsen gezeigt wurde (Kesper et al.,

2007) und einige Aktinregulatoren in beiden Strukturen auftreten (Übersichtsartikel Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).

In der Tat findet ein heuristischer Datenbankvergleich (BLAST, Altschul et al., 1990) mit der Aminosäure-Sequenz von Blow im Zebrafisch-Proteom Skap2 als ähnlichstes Protein. Dabei wird der E-value mit 0.076 angegeben und die Gleichheit der PH-Domänen beträgt 25 % während die strukturelle Ähnlichkeit der Domänen 48 % beträgt.

Sucht man aber mit der Aminosäure-Sequenz von Skap2 nach Homologen in *Drosophila* wird keineswegs nur Blow ausgegeben. Vielmehr scheinen neben dem unbeschriebenen CG 31772 (E-value $2e^{-5}$) und dem CAP-Protein (E-value $7e^{-5}$) besonders das Abelson interactor-Protein (Abi, E-value $2e^{-5}$) und das Adaptorprotein Dock (E-value $7e^{-5}$) Ähnlichkeit mit Skap2 aufzuweisen. Dabei ähneln sich besonders die SH3-Domänen der Proteine (42 % Identität für Abi und 36 % für Dock. Strukturelle Ähnlichkeit 53 % für Abi und 44 % für Dock). Blow weist in dieser Suche einen E-value von 0.024 auf. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen von Blow und Skap2 finden sich im Anhang (siehe Anhang, Abb. 9.8).

Um weitere Hinweise darauf zu finden, welche Funktionen das Protein ausüben könnte und ob es Ähnlichkeiten mit Blow aufweist, wurde auch von Skap2 eine *in silico* Analyse durchgeführt (siehe 5.9).

5.9 Die *in silico*-Analyse von Skap2 findet Tyrosin 241 als Phosphorylierungsstelle in verschiedenen Bindemotiven

Analog zu der *in silico*-Analyse von Blow wurde eine Analyse mit der Aminosäure-Sequenz von Zebrafisch-Skap2 durchgeführt, um herauszufinden, ob es – unabhängig von der putativen Homologie und der PH-Domäne – weitere Ähnlichkeiten zwischen den Proteinen gibt. Es gilt dabei zu beachten, dass Skap2, anders als Blow, neben der PH-Domäne noch über eine C-terminale SH3-Domäne verfügt, die ebenfalls aus der Analyse ausgeschlossen wurde.

5.9.1 Die Suche nach putativen Phosphorylierungsstellen in Skap2

Zur Vorhersage der Phosphorylierungsstellen im Zebrafischprotein Skap2 wurde der NetPhos 2.0-Server verwendet (Blom et al., 1999). Dabei wurden für Skap2 10 Serine,

5 Threonine und 5 Tyrosine als putativ phosphoryliert ausgegeben (siehe Tabelle 5.7). Phosphorylierungen, die mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 50 % angegeben wurden, wurden nicht berücksichtigt. Aminosäurereste, die in der PH- oder der SH3-Domäne liegen, werden nur in Klammern angegeben.

Aminosäure	Anzahl	Position
Serin	10	13, 29, 49, 75, (120, 143, 192), 226, 228, 229
Threonin	5	70, 81, (165), 268, (305)
Tyrosin	5	89, 221, 241, 280, (307)

Tabelle 5.7: putative Phosphorylierungsstellen in Skap2. Angezeigt werden nur die durch NetPhos 2.0 mit einer Wahrscheinlichkeit von über 50 % angegebenen Phosphorylierungsstellen. Die in Klammern angegebenen putativen Phosphorylierungsstellen liegen in der PH- oder der SH3-Domäne.

5.9.2 Die Suche nach Protein-Protein-Bindemotiven in Skap2

So wie auch Blow weist Skap2 verschiedene Protein-Protein-Bindemotive auf. Außerhalb der PH- und SH3-Domänen weist das Protein Bindemotive für diverse Domänen (FHA, PDZ, NTD, nicht-kanonische SH3, WW) sowie Glykosylierungsmotive, Phosphorylierungsstellen, Erkennungsmotive für SUMO-1, CtBP und AP, sowie Bindestellen für Prolin-dirigierte Kinasen auf.

Die Ergebnisse werden in Tabelle 5.8 zusammengefasst. In Ergänzung zu der Analyse mit dem ELM-Server wurde auch für Skap2 eine Analyse mit dem ScanSite 2.0-Programm durchgeführt. Die Ergebnisse, die damit im 'High Stringency' Modus gefunden wurden, finden sich in Tabelle 5.9. Da auch hier nur jene Ergebnisse, die nicht in den Domänen von Skap2 liegen, berücksichtigt wurden, ist nur Tyrosin 241 als Motiv für verschiedene Kinasen (Src, Lck, Fgr) bzw. als SH2-Domänen-Bindemotiv verschiedener Proteinen (Lck, Shc, Fgr, Fyn, Src) aufgeführt. Dabei ist auffallend, dass Skap2 – ähnlich wie Blow mit Tyrosin 342 – über ein Tyrosin verfügt, dass knapp hinter der PH-Domäne liegt und von verschiedenen SH2-Domänen gebunden werden kann. Wie in Blow sind die meisten putativen Bindepartner Kinasen, die im Fall von Skap2 sogar in 'High Stringency'-Modus mit der Kinase-Gruppe an das Tyrosin binden können. Die Ergebnisse werden in Abbildung 5.13 zusammengefasst.

Im 'Medium Stringency'-Modus finden sich auch in Skap2 sehr viele weitere Interaktionspartner. Darunter Erk1 (P65, T268), die Casein Kinase 1 und 2 (S75, T81), die Lck-Kinase (Y89), die Src-Kinase (Y221), die Insulin Rezeptor-Kinase (Y221), Shc-SH2 (Y221), Cortactin-SH3 (Y266) und Grb-SH2 (Y280). Außerdem werden im 'Medium Stringency'-Modus viele weitere SH2-Domänen (SHIP, PLCg, Nck, Itk, Abl, p85) und Kinasen (PDGFR, EGFR) als Bindepartner von Tyrosin 241 gefunden. Inwieweit diese Partner für eine Funktion von Skap2 oder gar eine Funktionalität von Skap2 in *Drosophila* wichtig sind, ist kaum zu bestimmen. Allerdings gibt die Tatsache, dass auch Abelson und Nck als Partner für Tyrosin 241 gefunden werden, einen weiteren Hinweis darauf, dass dieses Tyrosin eine vergleichbare Rolle spielen könnte wie Y342 in Blow. Eine Phosphorylierung dieses Tyrosins in Vertebraten wurde bereits beschrieben (Marie-Cardine et al., 1998).

putative Bindedomäne	Aminosäure-Sequenz in Skap2	Position
CtBP	[PG][LVIPME][DENS]L[VASTRGE]	25-29
FHA	..(T)..[ILV].	7-13, 18-24, 269-275
FHA	..(T)..[DE].	79-85
PDZ (Klasse III)	.[DE].[IVL]	20-23, 25-28, 89-92, 222-225, 237-240, 241-244, 246-249
SH3 (nicht kanonisch)	...[PV]..P	246-252, 249-255, 257-263, 260-266, 263-269
NTD	[PA][P][FYWIL]S[P]	250-254
WW (Klasse IV)	..[ST]P.	92-97, 265-270
CK1 (Phosph.)	S..([ST])...	75-81, 78-84
CK2 (Phosph.)	...([ST])..E	10-16, 225-231
GSK3 (Phosph.)	...([ST])...[ST]	6-13, 10-17, 223-230
N-GLC	.(N)[P][ST]	26-31, 274-279
PIKK (Phosph.)	...([ST])Q..	225-231
ProDKin (Phosph.)	...([ST])P..	92-98, 265-271
SUMO	[VILMAFP]K.E	23-26
AP	Y..[LMVIF]	89-92, 241-244

Tabelle 5.8: Bindemotive für Protein-Protein-Interaktionen in Skap2. Auflistung aller 'Eukaryotischen Linearen Motive' in Skap2 nach dem ELM-Server, mit Ausnahme der Motive, die in den Domänen von Skap2 liegen.

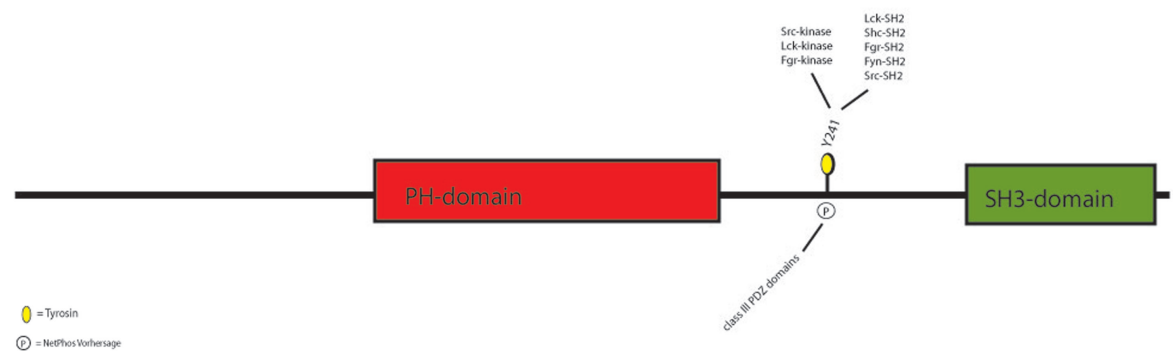


Abbildung 5.13: Schematische Darstellung von Skap2. Das Bild zeigt alle putativen Bindemotive und Phosphorylierungsstellen, die sowohl in NetPhos 2.0 als auch im ELM-Server und im 'High Stringency'-Modus in ScanSite 2.0 gefunden werden und die nicht in einer der Domänen liegen. Oberhalb des Proteins sind die Ergebnisse aus ScanSite 2.0 dargestellt, während die Ergebnisse aus dem ELM-Server unterhalb des Proteins dargestellt sind.

putative Bindestelle	Aminosäure-Motiv in Skap2	Protein
Y241	ILPDDDIYEELPEED	Src Kinase Lck Kinase Fgr Kinase Lck SH2 Shc SH2 Fgr SH2 Fyn SH2 Src SH2

Tabelle 5.9: Bindemotive für Domänen spezifischer Proteine in Skap2. Auflistung der im 'High Stringency'-Modus gefundenen Bindemotive nach ScanSite 2.0. Bindemotive in der PH-Domäne wurden nicht aufgeführt.

5.10 Expressionen von *skap2* im *Drosophila*-Embryo können keine Funktionalität des Proteins in der Fliege beweisen

5.10.1 *skap2* kann in Fliegenembryonen exprimiert werden

Um zu überprüfen, ob Skap2 die Funktion von Blow in *Drosophila*-Embryonen übernehmen kann oder diese stört, sollte das Zebrafisch-Skap2-Protein ektopisch in Fliegenembryonen exprimiert werden. Dazu konnte ein Stamm von R.H. Schröter verwendet

werden (Dissertation, 2006), der den ORF von *skap2* hinter der UAS-Sequenz auf dem dritten Chromosom trägt. Da dieses Konstrukt kein Epitop zum Nachweis trägt und kein Skap2-Antikörper verfügbar ist, musste auf andere Weise die Expression des Konstrukts nachgewiesen werden. Dazu wurde der UAS-*skap2*-Stamm gegen die *wg*-Gal4 Treiberlinie gekreuzt, so dass *skap2* im *wg*-Muster nachweisbar sein sollte. Schließlich wurde eine *in situ*-Hybridisierung mit einer *skap2*-spezifischen Sonde durchgeführt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 5.14A zu sehen. Skap2 wird offensichtlich im Embryo exprimiert; der Fliegenstamm ist also prinzipiell funktional.

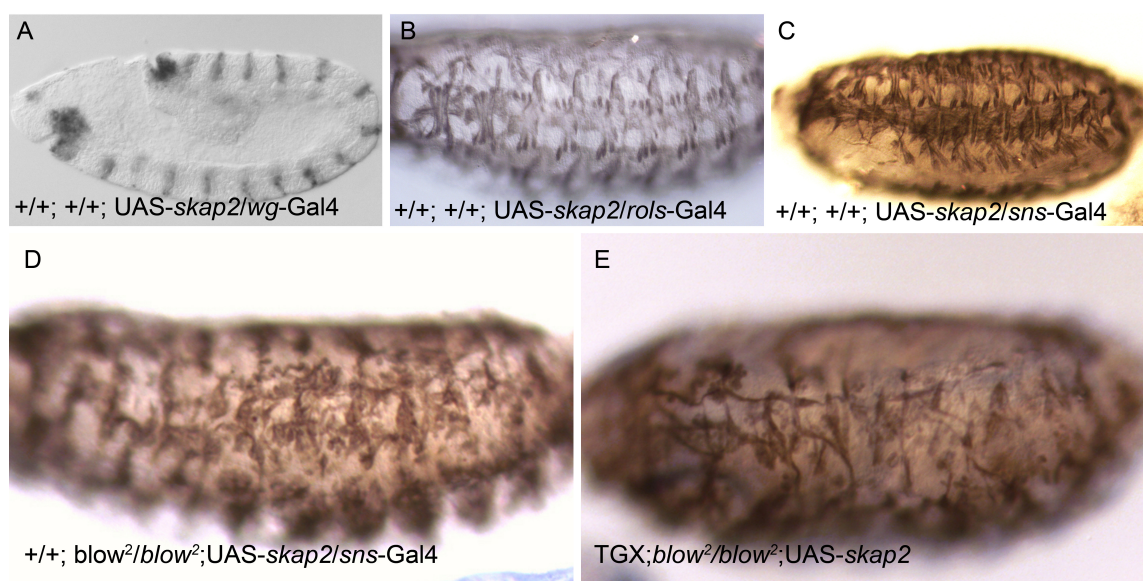


Abbildung 5.14: Die Transkription von Zebrafisch-Skap2 im *Drosophila*-Embryo. (A) Nachweis der *skap2*-Expression im Embryo auf RNA-Ebene. UAS-*skap2*/wg-Gal4-Embryonen zeigen in einer *in situ*-Hybridisierung mit einer *skap2*-spezifischen Sonde, dass das UAS-Konstrukt funktional ist und dass *skap2*-RNA ektopisch im Embryo exprimiert wird. (B) Die Expression von Skap2 in FCs vor wildtypischem Hintergrund. Skap2 in den FCs stört die Myoblastenfusion nicht. (C) Die Expression von Skap2 in FCs vor wildtypischem Hintergrund. Anterior zeigt der Embryo leichte Unregelmäßigkeiten, aber keinen generellen Fusionsdefekt. (D) Rettungsexperiment mit Skap2. *sns*-getriebenes Skap2 kann den *blow²*-Phänotyp nicht retten. (E) Weiteres Rettungsexperiment mit Skap2. *twist*-Gal4 getriebenes Skap2 kann den *blow²*-Phänotyp nicht retten. Die Bilder B, C, D und E zeigen das Muskelmuster in einer anti-β3-Tubulin-Antikörperfärbung.

5.10.2 Die ektopische Expression von Skap2 stört die Myoblastenfusion von *Drosophila* nicht

Wie auch für die UAS-Konstrukte der Blow-Varianten sollte mit UAS-*skap2* überprüft werden, ob eine ektopische Expression in den Founderzellen die embryonale Muskelentwicklung stört. Dazu wurde UAS-*skap2* mit dem *rols*-Gal4 Treiber getrieben. Die

Myoblastenfusion ist nicht gestört (Abb. 5.14B); das Muskelmuster sieht wildtypisch aus. Es fallen keine unfusionierten Myoblasten auf.

Eine ektopische Expression von Skap2 in den FCMs in wildtypischem Hintergrund zeigt eine ähnlich wildtypische Entwicklung der Muskulatur (Abb. 5.14C). Die Fusionen finden in wildtypischem Ausmaß statt und das Muskelmuster ist sehr geordnet. Leichte Unregelmäßigkeiten im anterioren Bereich des Embryos scheinen daher nicht auf fehlende Fusionen zurückzuführen zu sein, da das Fusionsvermögen in anderen Segmenten nicht eingeschränkt zu sein scheint.

5.10.3 Skap2 beeinflusst den *blow*²-mutanten Phänotyp nicht

Sollte Skap2 tatsächlich ein Ortholog von Blow sein, ist es denkbar, dass eine Expression von Skap2 den starken Fusionsphänotyp von *blow*² partiell retten kann. Daher wurde der UAS-*skap2*-Fliegenstamm in den *blow*²-mutanten Hintergrund eingekreuzt und mit Fliegen verkreuzt, die neben *blow*² noch *twist*-Gal4 (TGX, Abb. 5.14E) oder *sns*-Gal4 (Abb. 5.14D) tragen. Dabei hat *twist*-Gal4 den Vorteil, dass er ein höheres Expressionsniveau hervorrufen kann als *sns*-Gal4.

Beide Rettungsexperimente zeigen keine Auswirkungen auf den *blow*²-Phänotyp. Abbildung 5.14D zeigt einen etwas jüngeren Embryo (ca. Stadium 14), bei dem der klassische 'bunch of grapes'-Phänotyp mit vielen unfusionierten FCMs zu sehen ist. Abbildung 5.14E zeigt, dass auch bei einer stärkeren Expression durch den *twist*-Gal4-Treiber keine Rettung stattfindet. Wie in *blow*²-Embryonen üblich, zeigt die Färbung kein regelmäßiges Muskelmuster mehr. Die verbleibenden, stark verdünnten Muskeln verlaufen häufig schräg und überschreiten die Hemisegment-Grenzen des Embryos. Gezeigt ist ein Embryo des Stadiums 16.

6 Diskussion

6.1 In *blow*²-Embryonen wird kein Blow exprimiert und die Myoblastenfusion stoppt nach der Ausbildung des Präfusionskomplexes

Wie unter 5.1 und in Doberstein et al. gezeigt, ist der *blow*²-Phänotyp mit vielen unfusionierten Myoblasten sehr stark ausgeprägt (Doberstein et al., 1997). Dabei bilden die Mutanten zwar gelegentlich noch zwei- bis dreikernige Precursorzellen aus; sind aber nie in der Lage Myotuben mit wildtypischer Kernzahl zu bilden (Doberstein et al., 1997). Mit einem Antikörper, der gegen den N-Terminus des Blow-Proteins gerichtet ist, wurden immunhistologische Analysen an *blow*²-Embryonen durchgeführt. Diese zeigen eindeutig, dass in den Mutanten kein Blow-Protein nachweisbar ist (Abb. 5.1). *blow*² stellt also auf Protein-Ebene eine Null-Mutante dar. Inwieweit *blow*² auch eine transkriptionelle Null darstellt, ist Gegenstand von 6.2.

Eine Theorie dazu, wie es zu den initialen ersten Fusionen kommen kann, wird in Beckett und Baylies (2007) postuliert. Darin wird vermutet, dass die ersten Fusionen zwischen FCs und FCMs stattfinden, die ohnehin im sehr jungen Embryo benachbart sind und sehr eng nebeneinander liegen. Da – im Gegensatz zu dem zweiten Fusionsschritt – in den initialen Fusionen nie die ultrastrukturellen Merkmale Präfusionskomplex und elektronendichte Vesikel beobachtet werden konnten (Schröter et al., 2006, mündliche Kommunikation S.F. Önel), scheinen die ersten Fusionen ultrastrukturell anders abzulaufen. Die Tatsache, dass *blow*² Embryonen teilweise mehrkernige Precursorzellen ausbilden können, deutet darauf hin, dass Blow für den ersten Fusionsschritt z. T. abkömmlich ist. Da darüber hinaus auch noch der Präfusionskomplex aufgebaut wird, scheint auch die Vesikelbildung in *blow*²-Embryonen zumindest teilweise ungestört zu sein (Doberstein et al., 1997; Schröter et al., 2004). Eine putative Funktion von Blow ist das Auflösen der Vesikel an der Fusionsstelle, was nach einer

Hypothese von Doberstein et al. (1997) zum Aufbau der elektronendichten Plaques führt. Diese Theorie spricht dafür, dass die ultrastrukturellen Merkmale in der Tat erst im zweiten Fusionsschritt auftreten, da *blow*-Mutanten teilweise erst im zweiten Schritt in der Entwicklung stoppen. Allerdings ist der Fusionsphänotyp für *blow*²-Embryonen als sehr symmetrisch beschrieben worden, d.h. die Vesikel lagern sich paarweise an der Membran der Precursorzelle und der FCMs an (Doberstein et al., 1997). Diese Symmetrie liesse sich nur schwer erklären, wenn Blow tatsächlich für die Vesikelauflösung verantwortlich ist, da Blow nur in den FCMs exprimiert ist (Schröter et al., 2006). Allerdings sind die Beschreibungen der Signalkaskaden in Precursorzelle und FCM bislang so unterschiedlich, dass die Ausbildung der Vesikel zwar phänotypisch symmetrisch ist, diese Symmetrie auf molekularer Ebene aber nicht gegeben sein muß. Sollte Blow also tatsächlich für das Auflösen der Vesikel vonnöten sein, müsste ein analoger 'Player' die Aufgabe in den Precursorzellen übernehmen. Neuere Daten lassen dies allerdings unwahrscheinlich erscheinen: Mit der Beschreibung *sing*-Phänotyps ist eine Mutante gefunden worden, die auch nach der Ausbildung des Präfusionskomplexes in ihrer Entwicklung stoppt, bei der aber – anders als bei *blow*² – eine Anhäufung von Myotuben mit Präfusionskomplexen beschrieben wurde (Estrada et al., 2007). Daher scheint Sing ein besserer Kandidat für die Auflösung der Vesikel zu sein als Blow, da es hier zu keine Akkumulation von Präfusionskomplexen kommt (Doberstein et al., 1997).

Es wäre interessant, zu sehen, ob Embryonen schon in den ersten Fusionsschritten FuRMAS ausbilden (siehe 6.5 für weitere Diskussionen), da diese Struktur Blow im Aktin-reichen Zentrum enthält. Da FuRMAS als Kontaktstrukturen beschrieben sind (Kesper et al., 2007), ist es möglich, dass die Fusion zwischen eng benachbarten Zellen auch ohne FuRMAS ablaufen kann, was im Einklang mit dem *blow*²-Phänotyp stünde, da in diesem die ersten Fusionen teilweise stattfinden können.

6.2 Die Sequenzierung von *blow*² zeigt eine Deletion von 271 bp sowie drei Basenaustausche auf

Obwohl das *blow*²-Allel schon 1993 durch eine EMS-Mutagenese hergestellt wurde (Van Vactor et al., 1993) und sein starker Phänotyp in der Myoblastenfusion seit 1997 beschrieben ist (Doberstein et al., 1997), wurde bislang noch nicht die molekulare Läsion des Allels beschrieben. In dieser Arbeit ist es gelungen, durch Einzel-Embryo-PCR an homozygoten *blow*²-Embryonen zu zeigen, dass *blow*² neben einem Basenaustausch

in der 5'UTR und einem weiteren Basenaustausch im zweiten Intron des Gens eine Deletion von 271 Basenpaaren trägt (5.2).

Ob der Basenaustausch in der 5' UTR eine Rolle spielt, ist schwer vorherzusagen. Es ist schwierig zu beurteilen, ob die betroffene Base für die Funktion der 5'UTR, also für die Translationsinitiation, wichtig ist, aber bisher sind keine Hinweise darauf publiziert worden (siehe auch 6.4).

Es ist außerdem nicht unmöglich, dass der zweite Basenaustausch, der in dem zweiten Intron des Gens liegt, eine Rolle spielt. Allerdings wurde in Schröter et al. (2006) mittels Reportergenexpression gezeigt, dass die Enhancer, die die *blow*-Expression im viszeralen und somatischen Mesoderm steuern, im ersten Intron liegen und daher nicht von dem Basenaustausch betroffen sind.

Die Deletion dagegen ist mit 271 bp relativ groß und liegt zudem über der zweiten Intron-/Exongrenze, so dass die Spleiß-Akzeptorsite des zweiten Exons nicht mehr vorliegt. Damit kann das zweite Exon nicht mehr als solches erkannt werden und würde voraussichtlich im Spleißvorgang entfernt. Da die Deletion aber im zweiten Exon endet, spricht nichts dagegen, dass die Donorsite des Exons wildtypisch vorliegt. Für den Spleißvorgang bedeutet das allerdings, dass das zweite Exon nicht einfach übersprungen werden kann, so dass eine RNA für ein verkürztes Blow-Protein vorläge. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Donorsite des zweiten Exons den Spleißvorgang stört, da auf die Donorsite des ersten Exons eine weitere Donorsite (des zweiten Exons) folgt. Ein weiterer Basenaustausch, kurz nach der Deletion im zweiten Exon bleibt ohne weitere Bedeutung, da das zweite Exon insgesamt nicht translatiert werden kann.

Da für Eukaryoten bekannt ist, dass mRNAs, die starke Störungen aufweisen, abgebaut werden, scheint die Produktion von einem verkürzten Blow-Protein in *blow*²-mutanten Embryonen unwahrscheinlich (Übersichtsartikel Doma und Parker, 2007; Conti und Izaurralde, 2005). Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Histochemie. *in situ*-Hybridisierungen an *blow*²-Embryonen zeigen kaum RNA von *blow* (Doberstein et al., 1997). Der Befund steht in Übereinstimmung mit der molekularen Analyse des *blow*²-Allels, und der Interpretation, dass auch kein verkürztes Protein von Blow in den Mutanten gebildet wird.

Seit einer Veröffentlichung von Beckett und Baylies (2007) wird erneut diskutiert, ob die Myoblastenfusion in zwei Schritten verläuft wie in Rau et al. (2001) und Schröter et al. (2004) postuliert. Dabei stützte sich die Zwei-Schritt-Theorie u. a. darauf, dass einige Mutanten – wie *blow*² – zwar zwei- bis dreikernige Precursorzellen, aber niemals

Myotuben mit einer wildtypischen Kernanzahl ausbilden können. Beckett und Baylies stellten dagegen, dass gerade *blow²*-mutante Embryonen nur in seltenen Fällen Zellen mit mehr als einem Kern ausbilden und dass diese Zellen durch einen nicht vollständig ausgeprägten Phänotyp der Mutante zustande kommen. Durch meine Sequenzierung des *blow²*-Allels scheint diese Theorie wenig wahrscheinlich. Da *blow²* eine größere Deletion trägt, die zusammen mit den histochemischen Befunden zeigt, dass in der Mutante gar kein funktionales Transkript bzw. Protein gebildet wird, handelt es sich bei *blow²* um eine genetische Null-Mutante. Eine unvollständige Ausbildung des *blow²*-Phänotyps scheint daher ausgeschlossen, da keinerlei Protein eine Restfunktion übernehmen könnte. Auch die Existenz eines Proteins mit einer redundanten Funktion zu Blow ist nicht wahrscheinlich. Dafür spricht der sehr starke Fusionsphänotyp der Mutante (siehe 5.1).

Zusammengenommen spricht die Sequenzierung des *blow²*-Allels also für die Existenz des Zwei-Schritte-Modells der Myoblastenfusion. Dabei ist Blow zumindest für die Entstehung einiger Muskeln für die Fusionen nach dem Precursorzell-Stadium wichtig.

6.3 Blow könnte der *in silico*-Analyse nach mit verschiedenen Proteinen interagieren; dabei scheint das Tyrosin 342 eine besonders wichtige Rolle zu spielen

6.3.1 Eine Phosphorylierung von Tyrosin 342 scheint sehr wahrscheinlich

Durch fortschreitende Entwicklung in den Algorithmen der Programme zur Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen zeichnet die Analyse der Blow-Sequenz heute ein etwas anderes Bild als in der Dissertation von R.H. Schröter 2006 (siehe 5.3.1).

Nach wie vor erkennen aber die verwendeten Programme NetPhos, ELM-Server und ScanSite in dem Tyrosin 342 ein Bindemotiv für verschiedene Proteine, insbesondere Kinasen. Nicht alle Kinasen, die hypothetisch mit dem Tyrosin interagieren, zeigen allerdings auch ein Expressionsmuster, dass eine Involvierung in die Muskelentwicklung bei *Drosophila* nahe legt (BDGP *in situ*-Projekt, Tomancak et al., 2002). Die Src- und Abelson-Kinasen zeigen ein passendes Expressionsmuster und kommen für eine Phosphorylierung und/oder Interaktion mit Blow in Frage. Schon in meiner Diplomarbeit 2005 sowie in der Dissertation von R.H. Schröter (2006) wurden mutante Phänotypen von *abelson* und *src* analysiert. Dabei zeigten die beiden *abelson*-Allele *abl^l* und

*abl*⁴ einen klaren Myoblastenfusionsphänotyp mit vielen unfusionierten Myoblasten, während weder *src42A*- noch *src64B*-mutante Embryonen einen eindeutigen Fusionsdefekt aufweisen. Daher ist die Abelson-Kinase ein guter Kandidat für die Phosphorylierung von Blow, zumal Tyrosin 342 in dem konservierten Abelson-Motiv I-Y-E-E-P liegt. Sowohl die Src-Kinasen als auch die Abelson-Kinase zeigen maternal exprimierte RNA (Wadsworth et al., 1985, Takahashi et al., 1996, Bennett und Hoffmann, 1992). Eine funktionale Bedeutung von Tyrosin 342 wird auch durch den Sequenz-Vergleich zwischen den *Drosophila*-Arten bekräftigt, da in allen untersuchten Arten das Abelson-Motiv absolut konserviert vorliegt (siehe 5.8.1).

Natürlich ist es möglich, dass die Src-Kinase auch eine Rolle in der Myoblastenfusion spielt. Zum einen werden Kinasen häufig redundant verwendet, so dass die Mutation einer Kinase nicht unbedingt einen drastischen Phänotyp hervorruft (Lu und Li, 1999). Dieser Möglichkeit sollte mit der Analyse von Doppelmutanten nachgegangen werden. Zum anderen ist es denkbar, dass die Src-Kinase Blow in anderem zellulärem Kontext als Abelson phosphoryliert.

Bislang steht der Beweis, dass Blow von Abelson phosphoryliert wird, allerdings noch aus. Zwar wurden in meiner Diplomarbeit klare Evidenzen dafür gefunden, dass Blow phosphoryliert wird, aber auch ein *in vitro*-Assay konnte nicht beweisen, dass Abelson die phosphorylierende Kinase ist. Rettungsexperimente, in denen *abelson*-Mutanten durch eine Überexpression von Kette gerettet werden sollen, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr ausgewertet werden. Eine Rettung würde in diesem Fall bekräftigen, dass Abelson Blow aktiviert, da Kette als genetischer Interaktionspartner von Blow nach Blow agiert (Schröter et al., 2004). Wenn Kette also *abelson*-Mutanten – ähnlich wie *blow*-Mutanten – retten kann, würde dies für eine Involvierung Abelsons in die Signaltransduktionskette oberhalb von Kette sprechen.

6.3.2 Ein Adaptorprotein, z. B. Dock, nicht aber Crk, könnte über eine Interaktion mit Blow weitere Schlüsselproteine zu den FuRMAS rekrutieren

Neben diversen Kinasen wurden auch zwei Adaptorproteine als Interaktionspartner von Blow vorhergesagt: ScanSite findet Nck als putativen Interaktionspartner von Tyrosin 342 sowie Crk als Interaktionspartner von P360 und Y378 (5.4).

Da bis heute nicht geklärt ist, wie das Fusionssignal von dem Rezeptormolekül Sns zu

Blow vermittelt wird, war Crk dabei von besonderer Bedeutung. Eine Interaktion von Mbc und Crk ist eindeutig belegt (Galletta et al., 1999), so dass eine Signaltransduktion von dem Adhäsionsmolekül Sns über Mbc und Crk zu Blow möglich schien. 2006 wurde allerdings gezeigt, dass Mbc auch mit deletierter Crk-Bindestelle den *mbc*-mutanten Phänotyp retten kann (Balagopalan et al., 2006). Ein globaler Hefe-2-Hybrid-Versuch hat darüber hinaus die Interaktion von Blow und Crk detektiert (Giot et al., 2003). Da in globalen Interaktionstests das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden kann, sollte die Interaktion verifiziert werden. Dazu habe ich in meiner Diplomarbeit 2005 bereits die Spleißvariante CrkL (mit längerer SH2-Domäne) mit Blow Δ N-113 getestet. Eine Interaktion konnte dabei nicht nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde das Experiment mit der Spleißvariante CrkS durchgeführt. Auch hier konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (siehe 5.4). Zusammenfassend sagen die Ergebnisse des CytoTrap-Assays also aus, dass Blow Δ N-113 nicht mit Crk interagiert. Dass die fehlenden N-terminalen 112 Aminosäuren für eine Interaktion nötig sind, scheint gegenwärtig nicht wahrscheinlich, da die in der *in silico*-Analyse gefundenen Bindemotive dort nicht lokalisiert sind.

Zweifelsohne schließt dieses Ergebnis nicht aus, dass Blow über ein weiteres Protein indirekt mit Crk interagiert. Außerdem ist es möglich, dass Blow phosphoryliert vorliegen muss, um eine Interaktion mit Crk zu gewährleisten. SH2-Domänen binden häufig an phosphorylierte Tyrosine. Eine Möglichkeit, das zu testen, wäre die putative Kinase gleichzeitig mit Blow in Hefe zu exprimieren. Als 'intelligent guess'-Kinase könnte folglich die Abelson-Kinase mitexprimiert werden (siehe 6.3.1). Alternativ könnte das phosphomimetisch veränderte Blow-Konstrukt als Beutekonstrukt verwendet werden. Sowohl die Interaktion über ein Mediatorprotein als auch die putative Voraussetzung, dass Blow für eine Crk-Interaktion phosphoryliert vorliegen muss, könnte auch durch Immunpräzipitationen mit Embryonen-Proteinextrakt geklärt werden.

Neben den vorhergesagten Interaktionsstellen für Crk ist die vorhergesagte Interaktion mit der SH2-Domäne von Nck interessant. Das *Drosophila*-Homolog von Nck ist das Adaptorprotein Dreadlock (Dock). Laut dem BDGP *in situ*-Projekt ist *dock* nicht im Mesoderm exprimiert, allerdings zeigen neue, unveröffentlichte Analysen mit einem Dock-Antikörper durchaus eine Expression im Mesoderm (Schäfer et al., in Vorbereitung). Dock verfügt über drei SH3-Domänen und eine SH2-Domäne. Während die SH2-Domäne des Vertebratenhomologs Nck an phosphorylierte Tyrosinreste, z. B. von Rezeptoren bindet, schaffen die SH3-Domänen den Kontakt zu weiteren Proteinen, so

dass das Protein insgesamt als Adaptor wirkt (Lettau et al., 2009). Es ist bekannt, dass Dock mit mindestens zwei Proteinen (genetisch) interagiert, die für die Myoblastenfusion von Bedeutung sind. In *Drosophila* zeigen Doppelmutanten von *dock* und *kette* eine genetische Interaktion in der Neurogenese auf (Hummel et al., 2000). Die Vertebratenhomologe Nck und Hem-2 interagieren auch physikalisch miteinander (Kitamura et al., 1996 und 1997). Auch eine genetische Verbindung von Blow und Kette konnte durch Rettungsexperimente bereits gezeigt werden (Schröter et al., 2004).

Außerdem ist eine direkte Interaktion von Nck und WASP in der immunologischen Synapse beschrieben (Rivero-Lezcano et al., 1995; Lettau et al., 2009; Übersichtsartikel Buday et al., 2002). Interessanterweise ist die immunologische Synapse eine der Strukturen, die in Kesper et al. (2007) als strukturell homolog zu den FuRNAS beschrieben wurde. Es wird davon ausgegangen, dass die FuRNAS-Struktur in ihrem Aufbau mit dem Aktin-reichen Zentrum und dem Adhäsionsring der immunologischen Synapse ähnelt und dass einige Aktinregulatoren in beiden Strukturen eine Rolle spielen (siehe Einleitung, Kesper et al., 2007; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).

Weitere Bedeutung erlangt die putative Interaktion von Blow mit Dock/Nck durch den publizierten Pathway des Dok-Proteins ('Downstream of Kinase'-Protein). Das Dok-Protein, das aus Abl transformierten B-Zellen isoliert wurde und u.a. eine PH-Domäne besitzt, interagiert nach einer Phosphorylierung durch Abelson mit der SH2-Domäne von Nck (Buday et al., 2002). Nck und seine Interaktionspartner werden dann durch die PH-Domäne von Dok an die Plasmamembran rekrutiert (Noguchi et al., 1999; Buday et al., 2002). Blow weist durch seine PH-Domäne, sowie durch die putative Abelson-Phosphorylierungsstelle und die putative Dock/Nck-Bindestelle Ähnlichkeit zu Dok auf (5.3.1). Es scheint also möglich, dass Blow in der Myoblastenfusion eine ähnliche Rolle wie Dok übernimmt und nach einer Phosphorylierung, die als Relokalisationssignal wirkt, mittels seiner PH-Domäne das Nck-Homolog Dock und seine Bindepartner an die Plasmamembran rekrutiert. Damit könnte Blow eine Plattform am Fusionsort schaffen, an die die Fusogene rekrutiert werden können. In *Drosophila* existiert ein Dok-Protein, das nicht zu Blow homolog ist (FlyBase, NCBI). Das Protein ist nur eingeschränkt untersucht worden, und bislang wurde nur eine Rolle im Dorsalschluss postuliert (Biswas et al., 2006). Da für ein Adaptorprotein aber viele Interaktionspartner vorauszusetzen sind, könnten Dok und Blow auch in parallelen Signalwegen mit Dock interagieren.

Auch transiente Zell-Matrix Interaktionsstrukturen wie Podosomen und Invadopodi-

en weisen strukturelle und molekulare Ähnlichkeiten mit den FuRMAS auf (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).

In Invadopodien existiert ein Signalweg, in dem Src das sogenannte Tks5-Protein phosphoryliert, das daraufhin mit Nck interagieren kann und WASP aktiviert. Dabei wurde postuliert, dass die PX-Domäne von Tks5 die Rekrutierung zu den Invadopodien vermittelt (Stylli et al., 2009). Da Blow in das Aktin-reiche Zentrum der FuRMAS lokalisiert, sind auch hier die Elemente einer anfänglichen Phosphorylierung, einer Relokalisation zur Membran bzw. zum Aktin sowie eine (mögliche) Interaktion mit Nck/Dock gegeben.

Zusammengenommen ergeben die Daten der *in silico*-Analyse und Literaturrecherche, dass Blow vermutlich von Abelson an Tyrosin 342 phosphoryliert wird und daraufhin durch die PH-Domäne in das Zentrum der FuRMAS lokalisiert, wobei eine Interaktion mit dem Adaptorprotein Dock zur Rekrutierung weiterer Schlüsselproteine führen kann. Darüber hinaus könnte Dock mit seiner SH2-Domäne auch mit Sns interagieren.

Eine Interaktion könnte mittels Hefe-2-Hybrid-Experimenten oder Co-Immunopräzipitationen nachgewiesen werden.

6.4 Durch die Expression von *blowFL* und *blowΔN-113* konnte der *blow²*-Phänotyp nicht gerettet werden

Die Tatsache, dass weder die UAS-*blowFL*- noch die UAS-*blowΔN-113*-tragenden Fliegenlinien fähig sind, den *blow²*-Phänotyp zu retten (5.6.1), ist sehr überraschend. Selbst wenn der N-Terminus des Blow-Proteins für die Funktion unersetzlich sein sollte, hätte die Expression von BlowFL mittels der UAS-*blowFL*-Fliegen den wildtypischen Zustand wieder annähernd herstellen sollen. Dies gilt insbesondere dann, wenn der *twist*-Gal4-Treiber verwendet wurde, der eine starke Expression im Mesoderm hervorruft. Da eine ektopische Expression der UAS-Konstrukte in den FCs die Entwicklung nicht stört (siehe 5.5.4), sollte auch die Tatsache, dass eine Expression mit Hilfe des *twist*-Gal4-Treibers die Proteine sowohl in FCs als auch in FCMs treibt, kein Problem darstellen. Eine Expression, die zelltypspezifisch nur in den FCMs gesteuert wurde (siehe 5.6.1B und D), zeigte ebenfalls keine Rettung, wobei der dazu verwendete *sns*-Gal4-Treiber deutlich weniger starke Expressionen hervorruft. Zudem konnte die Expression der Proteine durch eine anti-Blow-Färbung an *wg*-Gal4-tragenden Embryonen eindeutig

bewiesen werden (5.5.2).

Durch eine RT-PCR an mRNA von Embryonen konnte ausgeschlossen werden, dass die zweite putative Spleißvariante des Proteins, Blow-RC, exprimiert wird (Abb. 5.11). Eine *in silico*-Analyse der genomischen Region von *blow* bestätigt darüber hinaus den postulierten Anfang des ORFs, so dass davon ausgegangen werden muss, dass der einzige, transkribierte ORF des Gens in den Rettungskonstrukten vorliegt und dennoch zu keiner Rettung von *blow*² führt.

Eine Regulation der Proteinlokalisierung über den Leader (5'UTR) oder Trailer (3'UTR), wie es für andere Gene bekannt ist, ist aus meiner Sicht auch keine wahrscheinliche Erklärung für die misslungene Rettung. Tatsächlich werden zwar 70 % aller mRNAs in *Drosophila* subzellulär lokalisiert (Lecuyer et al., 2007), so dass eine Lokalisation der mRNAs eine weitere Regulationsebene der Gene darstellen kann, die bei einer Expression mittels des UAS-ORF-Konstruktes fehlt. Aber durch Immunhistologie konnte bereits beobachtet werden, dass das Blow-Protein zunächst im Zytoplasma verteilt vorliegt und nach der Zell-Zell-Adhäsion zu dem Fusionsort lokalisiert (Kesper et al., 2007). Wenn also die Lokalisation nach der Translation des Proteins statt findet, scheint eine vorherige Lokalisation der mRNA unwahrscheinlich. Sollte diese Möglichkeit dennoch experimentell ausgeschlossen werden, so könnte man UAS-Konstrukte klonieren, bei denen jeweils der Leader oder der Trailer des Gens an den ORF von *blow* fusioniert wird. Wenn der ORF außerdem noch an GFP fusioniert wird, könnte man direkt im Mikroskop verfolgen, ob der Leader oder der Trailer eine Rolle in der subzellulären Lokalisation des Proteins spielt.

Diese Konstrukte können auch dazu verwendet werden, zu überprüfen, ob die Blow-Translation oder die mRNA-Stabilität ohne die 5'UTR bzw. 3'UTR herabgesetzt ist, wie es für andere Proteine gezeigt werden konnte. So ist z. B. die mRNA des Apolipoproteins B durch cis-regulatorische Elemente in der 5' und 3'UTR charakterisiert, deren Deletion das Expressionsniveau des Proteins erheblich herabsetzen (Pontrelli et al., 2004). Gegen diese These spricht zwar, dass das BlowFL-Protein im Embryo nachgewiesen werden konnte (5.5.2), aber eine Deletion der UTRs muss keineswegs mit der totalen Ablation der Proteinexpression einhergehen, sondern eher mit der Reduktion des Proteins, wie auch für das Apolipoprotein B gezeigt wurde (Pontrelli et al., 2004). Eine Verstärkung der Expression könnte auch über das Einkreuzen eines Verstärkerstammes erfolgen, der UAS-*gal4* auf allen drei Chromosomen trägt. Dass ein zu hohes Expressionsniveau einer Rettung nicht im Weg steht, konnte durch die Überexpression

von BlowFL in den FCMs durch den *sns*-Treiber gezeigt werden (Abb. 5.10).

Falls tatsächlich die Expressionshöhe des Proteins zu niedrig für eine Rettung ist, kann das auch einen anderen Grund haben. Sollte der Integrationsort von UAS-*blowFL* auf dem Chromosom in einer Region liegen, die im Mesoderm schwer aktivierbar ist, kann das die Expression herabsetzen, ohne dass ein cis-Element in einem der UTRs existieren muss.

Ein völlig anderer Ansatz zur Erklärung der fehlenden Rettung durch UAS-*blowFL* ist die Möglichkeit, dass das *blow²*-tragende Chromosom noch eine weitere Mutation trägt. Durch Färbungen mit anti-FASIII-Antikörper wurde bereits festgestellt, dass noch eine weitere Mutation in dem FASIII-kodierenden Gen (oder in einem Gen für seine Bildung/Stabilisierung) auf dem Chromosom liegt (5.2). Das bedeutet also, dass in der EMS-Mutagenese noch ein dritter Hit auf dem *blow²*-tragenden Chromosom liegen müsste, wenn das der Grund für die fehlende Rettung sein sollte. Zudem müsste diese dritte Mutation ein Gen betreffen, das ähnlich wie *blow* in der Myoblastenfusion wirkt oder für die Stabilität/Funktion des Blow-Proteins mitverantwortlich ist. Da das *blow¹*-Allel den gleichen Phänotyp zeigt wie *blow²* kann ausgeschlossen werden, dass der mutante Phänotyp auf die putative dritte Mutation des Chromosoms zurückgeht. Ein weiterer Rettungsversuch bei dem die transheterozygote Situation *blow²/blow¹* gerettet wird, könnte diese Erklärung verifizieren.

Die Hypothese, dass auf dem *blow²*-Chromosom ein weiteres fusionsrelevantes Gen betroffen ist, schien zunächst noch ein weiteres irritierendes Merkmal des *blow²*-Phänotyps erklären zu können: Obwohl Blow nachweislich nur in den FCMs exprimiert ist (Schröter et al., 2006, Kesper et al., 2007), zeigen *blow²*-Embryonen im Elektronenmikroskop einen stark symmetrischen Phänotyp (Doberstein et al., 1997). Dabei lagern sich die elektronendichten Vesikel paarweise an den Membranen von Precursorzelle und FCM an; diese Struktur wird aufgelöst, aber die Membranen bleiben auf beiden Seiten intakt. Wieso es zu diesem symmetrischen Stopp in der Entwicklung von *blow²*-Embryonen kommt, obwohl Blow nur in einem der Zelltypen exprimiert wird, konnte bislang nicht geklärt werden. Eine weitere Mutation auf dem Chromosom eröffnete die Möglichkeit, dass ein weiteres Gen, das entweder in beiden Zelltypen oder nur in den Precursorzellen exprimiert wird, für die Symmetrie (mit)verantwortlich ist. Dabei muss beachtet werden, dass die putative zweite Mutation in der lichtmikroskopisch beschreibaren Entwicklung nicht vor *blow* stoppen darf, da der *blow²*-Phänotyp durch

den identischen *blow*¹-Phänotyp verifiziert ist. Die Ausbildung von Precursorzellen, sowie die Zell-Zell-Erkennung und -Adhäsion müssten also auch in der putativen Mutante noch gewährleistet sein. Mit dem Fund, dass es in *sing*-Mutanten im Gegensatz zu *blow*²-Embryonen aber zu einer Anhäufung von Myotuben mit Präfusionskomplexen kommt (Estrada et al., 2007), scheint diese Hypothese allerdings an Gewicht zu verlieren: Da es in *blow*²-Embryonen keine Akkumulation von Präfusionskomplexen gibt, scheint das Auflösen der Vesikel auch ohne Blow noch gewährleistet zu sein, so dass *blow*²-Tiere später in ihrer Entwicklung stoppen als *sing*-Mutanten. Der symmetrische Phänotyp in *blow*² entspricht also eher der wildtypischen Situation in diesem Moment und entkräftet die Hypothese, dass Blow für die Vesikelauflösung verantwortlich ist (siehe 6.1, Doberstein et al., 1997). Für diese Aufgabe könnte stattdessen Sing nötig sein.

6.5 Duf-, Rst- und Sns-unabhängige Zelladhäsionen reichen aus, um Blow an Zellkontakten zu konzentrieren

Abbildung 5.12 zeigt, dass Blow gelegentlich auch noch in Mutanten lokalisiert, in denen keine Fusionen mehr stattfinden und bei denen die Zell-Zell-Adhäsionen vollkommen inhibiert sind (*duf*, *rst*). Dies ist insofern überraschend, da gezeigt wurde, dass Blow erst nach einer Adhäsion der Myoblasten zu dem Ort der Fusion akkumuliert (Kesper et al., 2007). Da allerdings in den mutanten Embryonen weniger Blow-Akkumulationen als im Wildtyp zu finden sind, kann es sich bei den gezeigten Exemplaren um zufällige Kontakte von Myoblasten handeln, da eine gezielte Adhäsion von Myoblasten ohne die founderzellstämmigen Signalmoleküle nicht möglich ist. Außerdem ist das in den FCMS exprimierte SH3-Domänen-Protein Mbc nicht für die Lokalisation von Blow nötig (Abb. 5.12E). Da Mbc über seine Crk-Bindedomäne mit dem Adaptorprotein Crk interagiert (Erickson et al., 1997) scheint es auch unwahrscheinlich, dass Crk für die Lokalisation nötig ist; zumindest ist die Interaktion mit Mbc dafür ohne Bedeutung (Balagopalan et al., 2006). Eine direkte Interaktion von Blow Δ N-113 und Crk konnte ohnehin bereits ausgeschlossen werden (siehe oben).

Die Tatsache, dass Blow prinzipiell auch dann lokalisieren kann, wenn die Fähigkeit zur Fusion im Embryo komplett verloren ist zeigt außerdem, dass FuRMAS prinzipiell auch im ersten Fusionsschritt auftreten können: Da *mbc*-Mutanten gar keine Fusionen durchführen können (Erickson et al., 1997), kann es in diesen Tieren nie zu

der Ausbildung von Precursorzellen und damit auch nie zu dem Erreichen des zweiten Fusionsschrittes kommen. Die Zelladhäsion ist jedoch in *mbc*-Mutanten erfolgreich; die ringförmigen Sns und Duf-Verbindungen wurden beobachtet (Kesper et al., 2007). Das stellt die Frage, ob diese Adhäsion ausreicht, um Blow zu rekrutieren und um die Aktin-Foci aufzubauen, um also die FuRMAS zu bilden. Die beobachtete Lokalisierung von Blow – die zusammen mit Aktin den zentralen Teil der FuRMAS-Struktur bildet – sagt damit aus, dass schon im ersten Fusionsschritt die FuRMAS-Bildung mit Aktin-Foci möglich ist. Dies stellt eine neue Erkenntnis dar, da FuRMAS mit Aktin-Foci bisher in späteren Fusionsschritten beobachtet wurden und entkräftet das Argument, dass die FuRMAS nur im zweiten Fusionsschritt auftreten, da der erste Fusionsschritt nur zwischen Zellen stattfindet, die benachbart liegen und daher keine stabilisierende Adhäsionsstruktur benötigen (Dissertation R.H. Schröter).

Auch *lmd*-Embryonen fusionieren nicht vollständig und bestätigen insofern die oben genannten Thesen (Duan et al., 2001). Das verwendete *lmd*^{E202}-Allel wurde aber noch nicht molekular charakterisiert, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich um ein hypomorphes Allel handelt. Anders als Duf, Rst oder Mbc ist Lmd nur in den FCMs exprimiert und stellt dort den einzigen bekannten FCM-spezifischen Transkriptionsfaktor dar. Lmd ist für die Expression von Sns und dem Transkriptionsfaktor Mef2 in FCMs nötig (Duan et al., 2001). Da sich auch in *lmd*^{E202}-Embryonen Blow-Lokalisierungen detektieren lassen (Abb. 5.12B'), folgt daraus wiederum, dass weder die Zielgene von Mef2 noch Sns für die Lokalisation von Blow essentiell sind. Die Analyse der *sns*²⁰⁻²³-Embryonen bestätigt diesen Befund für Sns (Abb. 5.12D). Die Tatsache, dass Sns für eine Akkumulation von Blow gelegentlich abkömmlich ist, ist überraschend. Zwar kann es – ähnlich wie bei *duf*, *rst*-Mutanten – sein, dass die Zell-Zell-Kontakte zufällig bestehen, aber da Sns das membranständige Adhäsionsmolekül der FCMs ist, liegt die Vermutung nahe, dass die intrazelluläre Domäne von Sns für eine Rekrutierung von Blow zur Membran wichtig ist. Ähnliches konnte auf Seite der Precursorzelle gezeigt werden, wo die intrazelluläre Domäne des Adhäsionsmoleküls Duf mit dem Multidomänen-Protein Rols interagiert (Menon et al., 2005, Kreisköther et al., 2006). In der analysierten Mutante *sns*²⁰⁻²³ ist die intrazelluläre Domäne allerdings nachweislich nicht mehr vorhanden, da ein Stopp-Codon am Anfang des Gens liegt (mündliche Kommunikation S. Abmayr), so dass eine Funktion der intrazellulären Domäne für die Blow-Lokalisierung ausgeschlossen werden kann. Diese Beobachtung passt zu der Beschreibung der FuRMAS, da für diese gezeigt wurde, dass Blow im Inneren der

Struktur mit Aktin kolokalisiert und nicht mit den Adhäsionsmolekülen, also Sns, im äußeren Ring kolokalisiert. Daher scheint einzig die Adhäsion der FCM zu einer anderen Zelle für die Akkumulation nötig zu sein. Dazu passt die Beobachtung, dass auch dann eine Blow-Lokalisation stattfindet, wenn sich die FCM irrtümlich an die Epidermis anlagert (Abb. 5.12D'). Wie allerdings der Kontakt, der zu einer Akkumulation des Blow-Proteins und damit zur FuRMAS-Bildung führt, von anderen Zell-Zell-Kontakten unterschieden wird, ist noch unklar. Für die eigentliche Lokalisation verfügt Blow über eine PH-Domäne. PH-Domänen sind durch ihre Bindung an Phosphoinositole oft mit Membranrekrutierungen verbunden (Übersichtsartikel Lemmon, 2004 und 2008).

2009 konnte gezeigt werden, dass das membranständige Protein Hibris bei Überexpression die Funktion von Sns partiell übernehmen kann (Shelton et al., 2009). Daher bleibt die Möglichkeit, dass die intrazelluläre Domäne von Hibris in *sns*²⁰⁻²³-Embryonen die Blow-Rekrutierung an die Membran übernimmt. Allerdings haben Experimente mit chimären Proteinen, die über die extrazelluläre Domäne von Sns und die transmembran- und intrazelluläre Domäne von Hibris verfügen, gezeigt, dass die Transmembran- und intrazellulären Bereiche von Hibris dieselben Bereiche von Sns nur ungenügend ersetzen können (Shelton et al., 2009). Gegen eine direkte Abhängigkeit der Lokalisation von Blow durch die intrazelluläre Domäne spricht außerdem die Kolokalisation von Blow mit Aktin im Zentrum der FuRMAS und die Lokalisation bei Attachment an die Epidermis.

Einfacher zu interpretieren ist die gezeigte Akkumulation von Blow in *kette*-Mutanten. Blow lokalisiert an den Zellkontakten (Abb. 5.12F') und da für Kette gezeigt wurde, dass es stromabwärts von Blow agiert (Schröter et al., 2004), ist nicht zu erwarten gewesen, dass ein Fehlen des Kette-Proteins die Lokalisation von Blow stört. Insofern ist das Ergebnis eine Bestätigung der postulierten Reihenfolge in der Signalkaskade der FCMs.

Dass die Embryonen des *arp3*^{*schwächling*}-Allels eine Lokalisation von Blow zeigen (Abb. 5.12G'), ist wenig verwunderlich, da *arp3* über eine starke maternale Komponente verfügt und somit selbst homozygote Tiere zumindest noch die Fusionen bis zur Precursorzelle ausbilden. Da elektronenmikroskopische Bilder zeigen, dass *arp3*^{*schwächling*}-Tiere die Fusionspore noch bilden können, dann aber nicht mehr zur Integration der FCMs fähig sind (Berger et al., 2008), ist es außerdem denkbar, dass die Lokalisation von Blow auch über das Precursorstadium hinaus nicht durch fehlendes Arp3 gestört wird: Da die Lokalisation von Blow die Bildung eines FuRMAS anzeigt, was wiederum die

Fusionsstruktur darstellt in deren Mitte voraussichtlich die Fusionspore gebildet wird (Kesper et al., 2007), kann nicht davon ausgegangen werden, dass ein Stopp in der Entwicklung nach der Fusionspore die Lokalisation von Blow an der Membran stört. Irritierenderweise scheint nach präliminären Analysen aber gerade in den *arp3^{schwächling}*-Embryonen weniger Blow exprimiert oder lokalisiert zu sein (5.12G und G'). Da allerdings Blow nicht mehr in bereits fusionierten Zelle exprimiert ist und höchstens in späteren Stadien wieder in den Muskelenden detektierbar wird, kann es sein, dass das Blow-Protein in den Myoblasten, die bereits eine Fusionspore gebildet haben, schon abgebaut ist. Somit könnte der Eindruck eines verringerten Proteinniveaus entstehen. Andererseits könnte die Funktion von Arp3 einen Hinweis darauf geben, wieso weniger Blow-Akkumulationen detektiert werden konnten. Arp3 ist Bestandteil des Arp2/3 Komplexes und wird somit für die Polymerisierung und Verzweigung neuer Aktinfilamente benötigt (Übersichtsartikel Takenawa und Miki, 2001). Da Blow auffällig mit dem F-Aktin-Zentrum im Inneren der FuRMA5 kolokalisiert (Kesper et al., 2007), kann eine inhibierte F-Aktin Polymerisation auch eine verringerte Lokalisation von Blow erklären - vorausgesetzt, dass Aktin für die Blow-Akkumulation im Zentrum der FuRMA5 von Bedeutung ist.

Eine Klärung der Situation könnte durch Analysen der Blow-Verteilung in *arp3^{schwächling}*, *wasp^{3D3-035}*-Doppelmutanten entstehen: Da in deren Fliegenembryonen keinerlei Fusionen mehr stattfinden (Berger et al., 2008), sollte es nicht zu einem Abbau des Proteins wegen erfolgter Fusion kommen. Wenn in diesen Embryonen also immer noch eine verringerte Anzahl an Blow-Akkumulationen zu finden ist, lässt das auf eine Funktion von Aktin in der Blow-Lokalisation schließen.

Zusammengefasst entsteht aus den Analysen der Blow-Verteilung in mutanten Embryonen folgendes Bild: Blow wird membrannah lokalisiert, wenn es zu einem Zell-Zell-Kontakt gekommen ist und liegt zuvor im Zytoplasma verteilt vor. Die Lokalisation ist gelegentlich unabhängig von den Adhäsionsproteinen Duf, Rst und Sns und dem FCM-ständigen Transkriptionsfaktor Lmd. Die Anzahl der membrannahen Blow-Akkumulationen ist in den mutanten Embryonen allerdings stark reduziert. Da die *lmd*-defizienten Tiere über ein sehr reduziertes Maß an Mef2 sowie Sns verfügen (Duan et al., 2001), sind auch nicht diese Proteine bzw. die Zielgene von Mef2 für die Konzentrierung von Blow an der Membran essentiell, was für Sns durch die Lokalisationen in *sns²⁰⁻²³*-Tieren bestätigt werden konnte. Für Sns kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass das Paralog Hibris die Funktion von Sns partiell übernimmt (Shelton et

al., 2009). Arp3 und damit die Aktin-Polymerisation scheinen eine Rolle in der Blow-Lokalisierung zu spielen, da Blow weniger stark bzw. weniger gut lokalisiert vorliegt. Wie stark und in welcher Form Arp3 auf Blow wirkt, sollte an Keimbahnklonen von Arp3, die über keine maternale Komponente mehr verfügen, getestet werden, da die maternal bereitgestellte RNA einen völligen Null-Phänotyp des Gens verhindert.

6.5.1 Die Expression von Blow-PH konnte nicht nachgewiesen werden

Die Frage, ob die PH-Domäne das Blow-Protein tatsächlich zu der Membran rekrutiert, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Zwar wurden ein UAS-*blow-PH*-Konstrukt erstellt und damit transgene Fliegenlinien etabliert, aber der Nachweis des Fusionsproteins durch anti-HA-Antikörperfärbung ist gescheitert. Durch frühere Arbeiten ist bekannt, dass ein HA-Epitop prinzipiell ausreicht, um einen Nachweis zu führen (Dissertation N. Kreisköther, 2005). Möglicherweise ist der Nachweis von nur einem HA-Epitop aber nicht sensitiv genug oder die Proteine lagen nicht lange genug stabil in der Zelle vor, um nachgewiesen werden zu können.

Um dennoch beobachten zu können, ob die isolierte PH-Domäne an die Membran rekrutiert wird und ob die Fähigkeit zur Lokalisierung in Blow Δ PH-Fliegen ablatiert ist, könnten die Proteine durch das Anhängen größerer bzw. mehrerer Epitope vergrößert werden. Mehrere Kopien eines Epitops hätten zudem den Vorteil, dass sich das Protein besser nachweisen lassen würde.

Die Expression von *blow Δ PH* kann alternativ Aufschluss darüber bringen, ob die PH-Domäne das Protein an die Membran dirigiert. Der Nachweis, dass Blow Δ PH exprimiert wird, konnte bereits mittels anti-Blow-Antikörperfärbung erbracht werden (siehe 5.5.2). Da sich auch hier ein Nachweis mit dem anti-HA-Antikörper als schwierig erwiesen hat (nicht gezeigt), wird das UAS-*blow Δ PH*-Konstrukt momentan in den *blow²*-Hintergrund eingekreuzt, um mittels anti-Blow zu zeigen, ob das Protein ohne PH-Domäne noch fähig ist, an die Membran zu lokalisieren. Da die Zelladhäsion in *blow²*-Mutanten unbeeinträchtigt ist, sollte ein eventueller negativer Befund ausschließlich auf die Deletion der PH-Domäne zurückzuführen sein.

6.6 Eine funktionelle Homologie von Blow und Zebrafisch Skap2 konnte nicht nachgewiesen werden

6.6.1 Neben Blow könnten auch Abi oder Dock Skap2-Orthologe in der *Drosophila*-Myoblastenfusion sein

In vorherigen Arbeiten wurde Blow als mögliches Ortholog von den Zebrafischproteinen Skap1/Skap-55 und Skap2 /Skap55-R/Skap-Hom identifiziert, wobei Skap2 die größere Ähnlichkeit zu Blow aufweist (Dissertation R.H. Schröter, 2006). Diese Proteine spielen vermutlich beim Aufbau der immunologischen Synapse eine Rolle und koloalisieren in der Synapse mit dem Aktin-reichen Zentrum (siehe 2.3.1). Da Blow in den FuRMAS auch mit dem Aktin-reichen Zentrum lokalisiert, sind die putativen Orthologe von besonderer Bedeutung für die Analyse von Blow, da die molekulare Funktion von Blow bis heute nicht eindeutig geklärt werden konnte und man sich Rückschlüsse aus der Funktion der Vertebratenproteine auf das *Drosophila*-Ortholog erhoffen kann. Außerdem konnte zwar bisher die strukturelle Homologie von FuRMAS zu der immunologischen Synapse beschrieben werden (Kesper et al., 2007), aber eine funktionelle Redundanz orthologer Proteine ist bislang noch nicht gezeigt worden. Während Blow als einzige prominente Domäne eine PH-Domäne aufweist, verfügen beide Skap-Proteine neben der PH-Domäne noch über eine C-terminale SH3-Domäne. Gemein ist außerdem beiden Skap-Proteinen ein Tyrosin, das kurz hinter der PH-Domäne liegt und von den SH2-Domänen verschiedener Kinasen erkannt werden könnte (siehe 5.9.2).

Die Konserviertheit zwischen Blow und Skap2 sollte allerdings experimentell bestätigt werden, da der heuristische Datenbankvergleich einige Fragen aufwirft: Während Blow in verschiedenen *Drosophila*-Spezies sehr gut konserviert ist (siehe 5.8.1) und die Skap-Proteine in den Vertebraten ebenso gut konserviert sind, weist das Alignment von Blow und Skap2 einige Lücken auf. Zwar findet ein spezifischer Datenbankvergleich der Blow-Aminosäure-Sequenz im Zebrafisch-Proteom Skap2 als ähnlichstes Protein, aber die umgekehrte Suche nach Orthologen von Skap2 im *Drosophila*-Proteom gibt Blow als Nummer 67 mit einem E-value von 0.024 aus. Vielmehr sind die Proteine Abelson interactor (Abi, E-value von $2e^{-5}$) und Dock ($7e^{-5}$) sowie einige unbeschriebene CGs dem Skap2-Protein ähnlicher (siehe 5.8.2). Interessanterweise können für beide Proteine eine Involvierung in den Myoblastenfusionsprozess postuliert werden. Während Abi als Interaktionspartner der Abelson-Kinase in der Phosphorylierung von

Blow involviert sein kann (Juang und Hoffmann, 1999), ist Dock in der *in silico*-Analyse als putativer Interaktionspartner von Tyrosin 342 aufgefallen (siehe 5.3.1).

Natürlich weisen bei allen drei Proteinen die Domänen die größte Ähnlichkeit zu Skap2 auf. Die SH3-Domänen von Abi und Dock sind zu 42 bzw. 36 % identisch mit der von Skap2. Die PH-Domäne von Blow ist zu 25 % identisch mit der von Skap2. Die strukturelle Ähnlichkeit der Domänen beträgt 58 % (Abi), 44 % (Dock) und 48 % (Blow). Da die PH-Domänen – im Vergleich zu den SH3-Domänen – besonders wenig einheitlich konserviert sind und noch wenig darüber bekannt ist, welche Struktur motive die – diversen – Funktionen der PH-Domänen vermitteln, ist es schwierig, eine Aussage darüber zu treffen, ob Blow ein Ortholog von Skap2 ist. Um Klarheit zu schaffen, sollte ein experimenteller Beweis geführt werden, der im folgenden Abschnitt diskutiert wird (siehe 5.10).

6.6.2 Eine Expression von *skap2* im Mesoderm des *Drosophila*-Embryos stört nicht die wildtypische Entwicklung und mildert nicht den *blow²*-Phänotyp

Um Gewissheit darüber zu gewinnen, dass Blow ortholog zu Skap2 ist, sollte Skap2 auf eine mögliche Funktionalität in der Fliegen-Myoblastenfusion untersucht werden. Eine Expression von *skap2* im *Drosophila*-Embryo konnte mittels *in situ*-Hybridisierung eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 5.14A). Wenn diese Expression im wildtypischen Hintergrund und mittels des *rols*-Gal4-Treibers zelltypspezifisch in den Founder-/Precursorzellen gesteuert wird, zeigt sich keine Störung der Muskelentwicklung (Abb. 5.14B), ebenso wenig wie bei der zelltypspezifischen Expression in FCMs (5.14C). Auch eine Expression im *blow²*-mutanten Embryo zeigt keine Veränderung der gegebenen Situation. Der *blow²*-Phänotyp verändert sich dabei nicht, egal ob der *twist*-Gal4-Treiber verwendet wird, der eine Expression in den FCs und den FCMs gewährleistet oder ob der schwächere, aber zelltypspezifische *sns*-Gal4-Treiber verwendet wird, der zu einer Expression von Skap2 nur in den FCMs führt (Abb. 5.14D und E).

Eine funktionelle Homologie von Skap2 zu Blow konnte also in der Fliege nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist das Resultat einer Protein-Expression in einem fremden Gewebe – und in diesem Fall sogar in einem anderen Organismus – keineswegs sicher vorhersagbar. Über die Expression von *skap2* ist wenig bekannt, aber ein globaler *in situ*-Hybridisierungsansatz hat keinen Hinweis auf eine *skap2*-Expression im Mesoderm

des Zebrafisches gegeben (persönliche Kommunikation B. Thisse).

Die Skap-Proteine sind in den Immunzellen des Zebrafisches Teil komplexer Signalwege und wie sich ein Protein außerhalb dieser Signalwege verhält, ist nicht vorhersehbar. So ist z. B. bekannt, dass Skap1 und Skap2 durch die Fyn-Kinase phosphoryliert werden und dass diese Phosphorylierung als Startsignal für den Aufbau und die Stabilisierung der immunologischen Synapse gilt (Marie-Cardine et al., 1998a; Übersichtsartikel Wang und Rudd, 2008). Interessanterweise liegt das phosphorylierte Tyrosin kurz hinter der PH-Domäne von Skap2 und somit in ähnlicher Lage wie Y342 in Blow. Auch ähneln sich die (putativen) Phosphorylierungsmotive von Fyn in Skap2 und Abl in Blow (Abb. 9.8). Die Fyn Kinase hat nach heutigem Wissensstand kein direktes Ortholog in *Drosophila*. Sie gehört zu der Familie der Src-Kinasen, von denen es die Kinasen Src42A und Src64B in *Drosophila* gibt. Da nicht davon ausgegangen werden kann, dass eine dieser Kinasen die Phosphorylierung von Skap in der Fliege übernehmen würde, ist es denkbar, dass das Startsignal für die Skap-Funktion fehlt und das Protein im *Drosophila*-Embryo schlicht inaktiv vorliegt. Diese Theorie könnte mittels einer phosphomimetischen Mutation überprüft werden.

Darüber hinaus agieren beide Skap-Proteine in einem Komplex mit dem ADAP-Protein (Marie-Cardine et al., 1998a und 1998b; Simeoni et al., 2004). Eine Suche nach homologen Proteinen in *Drosophila* hat keine wahrscheinlichen Kandidaten ergeben. Daher könnte es ebenso sein, dass Skap2 seine Funktion in dem Fliegenembryo nicht ausüben kann, weil der Bindepartner fehlt, mit dem das Protein in seiner wildtypischen Umgebung im Komplex agiert. Das ADAP-Protein verfügt über zwei SH3-Domänen über die z. B. der Kontakt zu weiteren Proteinen geschaffen werden kann.

Durch diese Unterschiede in dem natürlichen Umfeld der Proteine Blow und Skap2 muss die Expression von Skap2 in den Myoblasten von *Drosophila* als Versuch gewertet werden, eine Orthologie experimentell zu beweisen und kann nicht als Gegenbeweis zu der Hypothese verstanden werden, dass es sich um Orthologe handelt.

6.7 Ausblick und Modell: Die putative Interaktion von Blow und Abelson als Startsignal für die Aktinreorganisation

In der Erforschung der *Drosophila*-Myoblastenfusion gibt es noch viele ungeklärte Fragen und für die Klärung der Funktion von Blow sind noch weitere Experimente erforderlich. Auch die Signalweiterleitung von den Adhäsionsmolekülen der FCMs, Sns und

Hibris, zu Blow muss neu bewertet werden, da keine Interaktion von Blow und Crk nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.4) und die bereits gezeigte Interaktion von Mbc und Crk (Erickson et al., 1997, Galletta et al., 1999) nach neueren Daten nicht für die Myoblastenfusion notwendig ist (Balagopalan et al., 2006). Der postulierte Pathway in dem das Fusionssignal von Sns über Mbc und Crk zu Blow weitergeleitet wird, scheint also so nicht bestehen zu können. Ein erneuter Hefe-2-Hybrid-Versuch mit dem Adaptorprotein Dock und Blow kann klären, ob Dock mit Blow interagiert und daher für die Signalweiterleitung in Frage kommt.

Da die *in silico*-Analyse neben der PH-Domäne eine putative Phosphorylierungsstelle (Y342) aufgezeigt hat, die von verschiedenen Kinasen detektiert werden kann, scheint mindestens eine Kinase in dem Signalweg eine Rolle zu spielen. Aufgrund der mutanten Phänotypen ist dabei die Abelson-Kinase wahrscheinlicher als die Src-Kinasen (Diplomarbeit A. Sickmann, 2005, Dissertation R.H. Schröter, 2006). Darüber hinaus lokalisiert Blow nach der Adhäsion der FCMs an die Fusionsstelle im Inneren des FuRMAS-Ringes, wobei die Adhäsion der Zelle das entscheidende Lokalisierungssignal zu sein scheint (5.12 und Kesper et al., 2007).

Diese Ausgangssituation macht folgendes Modell für die Funktion von Blow möglich (Abb. 6.1): Die Abelson-Kinase phosphoryliert Blow an Tyrosin 342, woraufhin das Adaptorprotein Dock an ebendieses Tyrosin binden kann. Dabei bleibt offen, ob die Phosphorylierung von Blow zuvor als Startsignal für die PH-gesteuerte Membran-Rekrutierung wirkt. An der Membran wirkt das SH2-/SH3-Domänenprotein Dock dann als Adaptor, der weitere Schlüsselproteine, z.B. Fusogene oder Aktinregulatoren, zum Ort der Fusion rekrutiert. Es kommt schließlich im Inneren der FuRMAS zur Bildung der Fusionspore.

Ob Abelson darüber hinaus noch eine weitere Funktion in der Myoblastenfusion spielt, ist unklar. In COS7-Zellen konnte gezeigt werden, dass Abelson den Aktinregulator WAVE3 phosphoryliert und dass diese Phosphorylierung zu erhöhter Zellmigration und Lamellipodia-Bildung führt (Sossey-Alaoui et al., 2007). Da für das *Drosophila*-WAVE ein ähnliches Phosphorylierungsmotiv wie für WAVE3 existiert (Tyrosin 143), ist eine Interaktion und Phosphorylierung von WAVE durch Abelson (an der Fusionsstelle) auch plausibel.

Dieses Modell sollte experimentell bestätigt werden. Zunächst muss überprüft werden, ob Abelson tatsächlich die phosphorylierende Kinase ist. Bislang existierte keine fehlerfreie cDNA von *Drosophila abelson*, was die Forschung sehr erschwert hat. Dieses

Problem hat sich aber kürzlich gelöst (Ku et al., 2009), so dass ein Hefe-2-Hybrid-Experiment unternommen werden kann, um die Frage nach einer Interaktion mit Blow zu klären. Falls die bereits hergestellte UAS-*blowFL-Y342D*-Fliegenlinie die *abelson*-Mutante retten kann, wäre das darüber hinaus ein Hinweis für die Phosphorylierung von Tyrosin 342 durch Abelson. Auch eine Interaktion von Blow und Dock sowie Abelson und Scar/WAVE kann ggf. mit einem Hefe-2-Hybrid-Ansatz gezeigt werden. Ob eine Phosphorylierung von Scar/WAVE tatsächlich eine Aktivierung bedeutet, könnte durch die Expression einer phosphomimetisch mutierten Proteinversion von WAVE überprüft werden. Ein Rettungsversuch bei dem Kette die *abelson*-Mutante retten soll konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr ausgewertet werden. Sollte Kette retten können, würde das die Involvierung von Abelson in den Signalweg bestätigen. Schließlich würde auch die Herstellung eines anti-Abelson-Antikörpers neue Perspektiven eröffnen: Eine Antikörperfärbung könnte z. B. zeigen, ob Abelson im Zentrum der FuRMAS mit Aktin und Blow kolokalisiert oder zuvor im Zytoplasma mit Blow lokalisiert. Letzteres wäre ein Hinweis darauf, dass die Phosphorylierung die Translokation von Blow zum Aktin initiiert.

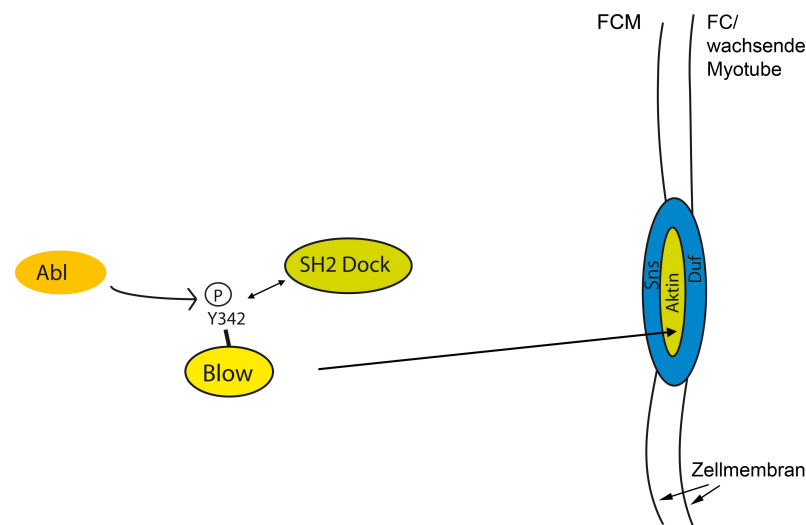


Abbildung 6.1: Modell: Blow interagiert nach einer Phosphorylierung mit Dock und wird an die Membran rekrutiert. Blow wird durch die Abelson-Kinase an Tyrosin 342 phosphoryliert und kann anschließend mit der SH2-Domäne von Dock interagieren. Es kommt zu einer Kolokalisation mit dem Aktin-reichen Zentrum der FuRMAS, wohin weitere Schlüsselproteine (durch Dock) rekrutiert werden. In blau: Adhäsionsring der FuRMAS. Dabei bildet das Adhäsionsmolekül Sns den Kontakt auf Seiten der FCMs während das Adhäsionsmolekül die analoge Funktion in den FCs bzw. Precursorzellen übernimmt. Der Aktin-Pfropf lokalisiert im Zentrum des FuRMAS.

Durch die detaillierte Beschreibung des *sing*-Phänotyps konnte Blow außerdem genauer in die Kaskade der Fusion eingeordnet werden (Abb. 6.2, Estrada et al., 2007). Während Sing für die Auflösung der Vesikel im Präfusionskomplex verantwortlich zu sein scheint, agiert Blow später, da in *blow*²-Mutanten keine Akkumulation von Präfusionskomplexen auftritt und somit die Auflösung der Vesikel auch ohne Blow noch gewährleistet scheint. Sollten sich die Vesikel tatsächlich in elektronendichte Plaques auflösen wie von Doberstein et al. (1997) postuliert wurde, wäre dieser Schritt in *blow*²-Mutanten voraussichtlich inhibiert, da bislang nur ein einziges Mal ein elektronendichter Plaque in *blow*²-Tieren gezeigt werden konnte (Estrada et al., 2007). Eindeutig ist jedenfalls, dass in *blow*²-Embryonen keine Vesikulierung der Membran stattfindet (Doberstein et al., 1997, Schröter et al., 2004). Das gilt auch für den genetischen Interaktionspartner von Blow, für Kette, in deren Mutanten allerdings elektronendichte Plaques gefunden wurden (Schröter et al., 2004). Da nach Richardson et al. (2007) Kette und WAVE für das Auflösen der Actin-Foci der FuRMAS nötig sind, ist es denkbar, dass Blow zuvor als Teil eines 'Checkpoint Systems' wirkt, das kontrolliert ob die Fusion durchgeführt werden soll (Doberstein et al., 1997). Weitere Komponenten dieses Checkpoints könnten z.B. über Dock zur Membran rekrutiert werden (siehe oben). Der Aktinregulator Arp3 ist schließlich für die Weitung der zytoplasmatischen Koninuität verantwortlich, was durch Analysen des *arp3*^{schwächling}-Allels gezeigt werden konnte, die zwar die Bildung der Fusionspore, nicht aber die Integration der FCMs in die wachsende Myotube gezeigt haben. Für Kette und Arp3^{schwächling} muss allerdings bedacht werden, dass eine abundante maternale Komponente besteht, die den mutanten Phänotyp ggf. einschränkt. Das Modell der Fusion ist in Abbildung 6.2 dargestellt.

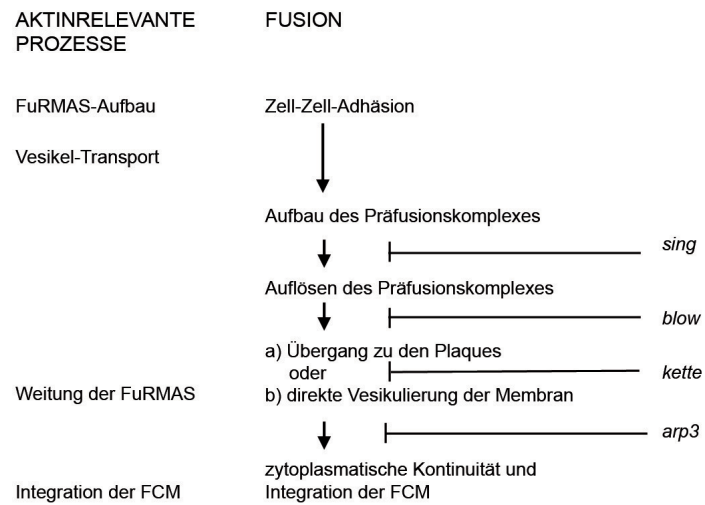


Abbildung 6.2: Modell: Blow stoppt in der Fusionskaskade nach dem Auflösen der elektronendichten Vesikel, aber noch vor der Membranvesikulierung. Die linke Spalte stellt die aktinrelevanten Prozesse der Fusion dar, während rechts daneben der gleichzeitige Fortgang der Fusion gezeigt ist. Die relevanten Gene werden dem Zeitschema rechts im Bild zugeordnet. Die Fusion beginnt mit der Zelladhäsion und dem Aufbau der Adhäsionsstruktur (FuRMAS), die ein aktin-reiches Zentrum besitzt (Kesper et al., 2007). Der aktin-vermittelte Vesikeltransport zu der Zellkontaktstelle (Kim et al., 2007), wird vom Aufbau des Präfusionskomplexes gefolgt. Die Vesikel dieses Komplexes werden vermutlich durch Sing aufgelöst (Estrada et al., 2007). *blow*²-Mutanten stoppen später in der Entwicklung als Sing, da es hier zu keiner Akkumulation von Präfusionskomplexen kommt (Doberstein et al., 1997), aber noch vor Kette. Kette wird nach Richardson et al. (2007) benötigt, um in Kooperation mit Scar/WAVE die Aktin-Foci aufzulösen; eine Vesikulierung der Membran ist in *kette*-Mutanten nicht gewährleistet. Nach der Vesikulierung der Membran an der Fusionsstelle spielt Arp3 eine Rolle in der Integration der FCM (Berger et al., 2008).

7 Abkürzungen

a	anterior
a. dest	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
β-Gal	β -Galaktosidase
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
d	dorsal
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Nukleotidtriphosphat
FASIII	Fasciclin III
FC	Founderzelle
FCM	Fusions-kompetenter Myoblast
FuRMAS	Fusion Restricted Myogenic Adhesive Structure
g	Gramm
ggf	gegebenenfalls
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molar
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer
o.g.	oben genannte/s/r
ORF	open reading frame
p	posterior
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
RNA	Ribonukleinsäure
sm	somatisches Mesoderm
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
St	Stadium
Tm	Schmelztemperatur
U	Unit
UTR	Untranslated Region
v	ventral
w/v	Gewicht pro Volumen

8 Literatur

- Abmayr, S.M., Balagopalan, L., Galletta, B.J. and Hong, S.-J. (2005). Myogenesis and Muscle Development. aus: Comprehensive Molecular Insect Science 2, Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (eds.), 1-43.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 215, 403-410.
- Artero, R.D., Castanon, I. and Baylies, M.K. (2001). The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. Development 128, 4251-4264.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (eds). (1993). Current protocols in molecular biology. John Wiley&Sons, New York.
- Balagopalan, L., Chen, M.H., Geisbrecht, E.R. and Abmayr, S.M. (2006). The CDM superfamily protein MBC directs myoblast fusion through a mechanism that requires phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate binding but is independent of direct interaction with DCrk. Mol Cell Biol. 2006 26, 9442-9455.
- Baylies, M.K., Bate, M. and Ruiz-Gomez, M. (1998). Myogenesis: a view from *Drosophila*. Cell 93, 921-927.
- Beckett, K. and Baylies, M.K. (2007). 3D analysis of founder cell and fusion competent myoblast arrangements outlines a new model of myoblast fusion. Dev Bio. 309, 113-125.
- Bennett, R.L. and Hoffmann, F.M. (1992). Increased levels of the *Drosophila* Abelson tyrosine kinase in nerves and muscles: subcellular localization and mutant phenotypes imply a role in cell-cell interactions. Development. 116, 953-966.
- Berger, S., Schäfer, G., Kesper, D.A., Holz, A., Eriksson, T., Palmer, R.H., Beck, L., Klämbt, C., Renkawitz-Pohl, R. and Önel, S.F. (2008). WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion. J Cell Sci. 121, 1303-1313.

- Birge, R.B., Kalodimos, C., Inagaki, F. and Tanaka, S. (2009). Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell Commun Signal.* 10, 7-13.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Biswas, R., Stein, D. and Stanley, E.R. (2006). *Drosophila* Dok is required for embryonic dorsal closure. *Development.* 133, 217-227.
- Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* 294, 1351-1362.
- Bogdan, S. and Klämbt, C. (2003). Kette regulates actin dynamics and genetically interacts with Wave and Wasp. *Development* 130, 4427-4437.
- Bogdan, S., Grewe, O., Strunk, M., Mertens, A. and Klämbt, C. (2004). Sra-1 interacts with Kette and Wasp and is required for neuronal and bristle development in *Drosophila*. *Development* 131, 3981-3989.
- Bour, B.A., Chakravarti, M., West, J.M. and Abmayr, S.M. (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev.* 14, 1498-1511.
- Brand, A.H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 118, 401-415.
- Breitner-Johnson, D. and LeRoith, D. (1995). Insulin-like growth factor-I stimulates tyrosine phosphorylation of endogenous c-Crk. *J Biol Chem.* 270, 5187-5190.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Trampont, A.C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R. and Ravichandran, K.S. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol.* 4, 574-582.
- Buday, L., Wunderlich, L. and Tamas, P. (2002). The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal.* 14, 723-731.
- Chavrier, P. and Goud, B. (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.* 11, 466-475.
- Chen, E.H., and Olson, E.N. (2001). Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell.* 1, 705-715.

- Chen, E.H., Pryce, B.A., Tzeng, J.A., Gonzalez, G.A. and Olson, E.N. (2003). Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, loner, and its effector ARF6. *Cell* 114, 751-762.
- Conti, E. and Izaurralde, E. (2005). Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol.* 17, 316-325.
- Cote, J.F. and Vuori, K. (2002). Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci.* 115, 4901-4913.
- Crouse, J. and Amorese, D. (1987). Ethanol precipitation: ammonium acetat as alternative to sodium acetat. *FOCUS* 9, 3-5.
- Donaldson, J.G. und Jackson, C.L. Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol.* 12, 475-482.
- Doberstein, S.K., Fetter, R.D., Mehta, A.Y. and Goodman, C.S. (1997). Genetic analysis of myoblast fusion: *blown fuse* is required for progression beyond the prefusion complex. *J Cell Biol.* 136, 1249-1261.
- Doma, M.K. and Parker, R. (2007). RNA quality control in eukaryotes. *Cell.* 2007 131, 660-668.
- Donaldson, L.W., Gish, G., Pawson, T., Kay, L.E. and Forman-Kay, J.D. (2002). Structure of a regulatory complex involving the Abl SH3 domain, the Crk SH2 domain, and a Crk-derived phosphopeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 14053-14058.
- Duan, H., Skeath, J.B. and Nguyen, H.T. (2001). *Drosophila* *Lame duck*, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. *Development.* 128, 4489-4500.
- Dworak, H.A. and Sink, H. (2002). Myoblast fusion in *Drosophila*. *Bioessays* 24, 591-601.
- Dyer, N., Rebollo, E., Dominguez, P., Elkhatab, N., Chavrier, P., Daviet, L., Gonzalez, C. and Gonzalez-Gaitan. (2007). Spermatocyte cytokinesis requires rapid membrane addition mediated by ARF6 on central spindle recycling endosomes. *Development* 134, 4437-4447.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., Kirschner, M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418, 790-793.

- Erickson, M.R., Galletta, B.J. and Abmayr, S.M. (1997). *Drosophila myoblast city* encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. J Cell Biol. 138, 589-603.
- Escalante, M., Courtney, J., Chin, W.G., Teng, K.K., Kim, J.I., Fajardo, J.E., Mayer, B.J., Hempstead, B.L. and Birge, R.B. (2000). Phosphorylation of c-Crk II on the negative regulatory Tyr222 mediates nerve growth factor-induced cell spreading and morphogenesis. J Biol Chem. 275, 24787-24797.
- Estrada, B., Maeland, A.D., Gisselbrecht, S.S., Bloor, J.W., Brown, N.H. and Michelson, A.M. (2007). The MARVEL domain protein, Singles Bar, is required for progression past the pre-fusion complex stage of myoblast fusion. Dev Biol. 307, 328-339.
- Feller, S.M., Knudsen, B. and Hanafusa, H. (1994). c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. EMBO J. 13, 2341-2351.
- Feller, S.M. (2001). Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. Oncogene 20, 6348-6371.
- Frasch, M. and Leptin, M. (2000). Mergers and Acquisitions: Unequal partnerships in *Drosophila* myoblast fusion. Cell 102, 127-129.
- Friedl, P. and Storim, J. (2004). Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse. Trends Cell Biol. 14, 557-567.
- Friedl, P., den Boer, A.T. and Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. Nat Rev Immunol. 5, 532-545.
- Galletta, B.J., Chakravarti, M., Banerjee, R. and Abmayr, S.M. (2004). SNS: Adhesive properties, localization requirements and ectodomain dependence in S2 cells and embryonic myoblasts. Mech Dev. 121, 1455-1468.
- Galletta, B.J., Niu, X.P., Erickson, M.R. and Abmayr, S.M. (1999). Identification of a *Drosophila* homologue to vertebrate Crk by interaction with MBC. Gene. 228, 243-252.
- Gassen, H.G. and Schimpf, G. (eds.). (1999). Genetische Methoden, eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Verlag, Heidelberg München.
- Gildor, B., Massarwa, R., Shilo, B.Z. and Schejter, E.D. (2009). The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate *Drosophila* myoblast fusion. EMBO Rep. 10, 1043-1050.

- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E. et al. (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. Science 302, 1727-1736.
- Gumieny, T.L., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A.C., Kinchen, J.M., Haney, L.B., Nishiwaki, K., Walk, S.F., Nemergut, M.E., Macara, I.G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, M.O. and Ravichandran, K.S. (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. Cell 107, 27-41.
- Hashimoto, Y., Katayama, H., Kiyokawa, E., Ota, S., Kurata, T., Gotoh, N., Otsuka, N., Shibata, M., Matsuda, M. (1998). Phosphorylation of CrkII adaptor protein at tyrosine 221 by epidermal growth factor receptor. J Biol Chem. 273, 17186-17191.
- Hernandez, S.E., Settleman, J. and Koleske, A.J. (2004). Adhesion-dependent regulation of p190RhoGAP in the developing brain by the Abl-related gene tyrosine kinase. Curr Biol. 14, 691-696.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C. (1999). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. Dev Biol. 209, 381-398.
- Hummel, T., Leifker, K. and Klämbt, C. (2000). The *Drosophila* HEM-2/NAP1 homolog KETTE controls axonal pathfinding and cytoskeletal organization. Genes Dev. 14, 863-873.
- Kahali, B., Bose, A., Karandikar, U., Bishop, C.P. and Bidwai, A.P. (2009). On the mechanism underlying the divergent retinal and bristle defects of M8* (E(spl)D) in *Drosophila*. Genesis. 47, 456-468.
- Kain, K.H. and Klemke, R.L. (2001). Inhibition of cell migration by Abl family tyrosine kinases through uncoupling of Crk-CAS complexes. J Biol Chem. 276, 16185-16192.
- Kesper, D.A., Stute, C., Buttgerit, D., Kreisköther, N., Vishnu, S., Fischbach, K.F. and Renkawitz-Pohl, R. (2007). Myoblast fusion in *Drosophila melanogaster* is mediated through a fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS). Dev Dyn. 236, 404-415.
- Kesper, D.A. (2005). Die Analyse der cis-Regulation des *rols*-Gens und die Beteiligung von Rols7 am Aufbau eines podosomenähnlichen adhesiven Komplexes (PILMAC), der eine zentrale Rolle in der Myoblastenfusion bei *Drosophila melanogaster* einnimmt. Dissertation Philipps-Universität Marburg.

- Kim, S., Shilagardi, K., Zhang, S., Hong, S.N., Sens, K.L., Bo, J., Gonzalez, G.A. and Chen, E.H. (2007). A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. *Dev Cell.* 12, 571-586.
- Kinashi, T. and Katagiri, K. (2005). Regulation of immune cell adhesion and migration by regulator of adhesion and cell polarization enriched in lymphoid tissues. *Immunology.* 116, 164-171.
- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T. and Matsuda, M. (1998). Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 12, 3331-3336.
- Knudsen, K.A. (1992) Fusion of myoblasts. aus *Membrane Fusion* von Wilschut, J. and Hoekstra, D. (editors). Marcel Dekker, Inc. New York.
- Koval, A.P., Blakesley, V.A., Roberts, C.T. Jr, Zick, Y. and Leroith, D. (1998). Interaction in vitro of the product of the c-Crk-II proto-oncogene with the insulin-like growth factor I receptor. *Biochem J.* 330, 923-932.
- Kreisköther, N. (2005). In der Myogenese von *Drosophila melanogaster* interagiert Rolling pebbles 7 in den Z-Scheiben der Sarkomere mit α -Aktinin und D-Titin/Kettin/Zormin, in der terminalen Z-Scheibe kolokalisiert es zudem mit Dumbfounded/Kirre. Dissertation Philipps-Universität Marburg.
- Kreisköther, N., Reichert, N., Buttgereit, D., Hertenstein, A., Fischbach, K.F. and Renkawitz-Pohl, R. (2006). *Drosophila* rolling pebbles colocalises and putatively interacts with alpha-Actinin and the Sls isoform Zormin in the Z-discs of the sarcomere and within Dumbfounded/Kirre, alpha-Actinin and Zormin in the terminal Z-discs. *J Muscle Res Cell Motil.* 27, 93-106.
- Ku, H.Y., Wu, C.L., Rabinow, L., Chen, G.C. and Meng, T.C. (2009). Organization of F-actin via concerted regulation of Kette by PTP61F and dAbl. *Mol Cell Biol.* 19, 3623-3632.
- Kurtz, F. (2003). Analyse potenzieller spezifischer Interaktionen zwischen Rolling pebbles und weiteren für die Myoblastenfusion essenziellen Proteinen mit dem Hefe-Two-Hybrid-System; und Versuche zur Detektion von Rols6+7 in Embryo-Proteinextrakten. Diplomarbeit Philipps-Universität Marburg.
- Lecuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T. R., Tomancak, P. and Krause, H. M. (2007). Global Analysis of mRNA Localisation

Reveals a Prominent Role in Organizing Cellular Architecture and Function. *Cell* 131, 174-187.

- Lee, J.H., Koh, H., Kim, M., Kim, Y., Lee, S.Y., Karess, R.E., Lee, S.H., Shong, M., Kim, J.M., Kim, J. and Chung, J. (2007). Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature*. 447, 1017-1020.
- Lemmon, M.A., Ferguson, K.M. and Abrams, C.S. (2002). Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett.* 513, 71-76.
- Lemmon, M.A. (2004). Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem Soc Trans.* 32, 707-711.
- Lemmon, M.A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9,99-111.
- Lettau, M., Pieper, J. and Janssen, O. (2009). Nck adapter proteins: functional versatility in T cells. *Cell Commun Signal.* 7, E-Pub.
- Letunic, I., Doerks, T. and Bork, P. (2009). SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.*, 37, D229-232.
- Linder, S. and Kopp, P. (2005). Podosomes at a glance. *J Cell Sci.* 15, 2079-2082.
- Lipton, B.H. and Königsberg, I.R. (1972). A fine-structural analysis of the fusion of myogenic cells. *J Cell Biol.* 53, 348-364.
- Lu, X. and Li, Y. (1999). *Drosophila* Src42A is a negative regulator of RTK signaling. *Dev Biol.*, 208, 233-243.
- Marie-Cardine, A., Verhagen, A.M., Eckerskorn, C. and Schraven, B. (1998). SKAP-HOM, a novel adaptor protein homologous to the FYN-associated protein SKAP55. *FEBS Lett.* 435, 55-60.
- Marie-Cardine, A., Hendricks-Taylor, L.R., Boerth, N.J., Zhao, H., Schraven, B. and Koretzky, G.A. (1998). Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130. *J Biol Chem.* 273, 25789-25795.
- Maqbool, T. and Jagla, K. (2007). Genetic control of muscle development: learning from *Drosophila*. *J Muscle Res Cell Motil.* 28, 397-407.
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A. and Murray, D. (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 31, 151-175.

- McLaughlin, S. and Murray, D. (2005) Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature*. 438, 605-611.
- Menon, S.D. and Chia, W. (2001). *Drosophila rolling pebbles*: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded. *Dev Cell*. 1, 691-703.
- Menon, S.D., Osman, Z., Chenchill, K. and Chia, W. (2005). A positive feedback loop between Dumbfounded and Rolling pebbles leads to myotube enlargement in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 169, 909-920.
- Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C.H., Kuriyan, J. and Miller, W.T. (1997). Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385, 650-653.
- Moore, C.A., Parkin, C.A., Bidet, Y. and Ingham, P.W. (2007). A role for the Myoblast city homologues Dock1 and Dock5 and the adaptor proteins Crk and Crk-like in zebrafish myoblast fusion. *Development*. 134, 3145-3153.
- Nagar, B., Hantschel, O., Young, M.A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G. and Kuriyan, J. (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*. 112, 859-871.
- Nakashima, N., Rose, D.W., Xiao, S., Egawa, K., Martin, S.S., Haruta, T., Saltiel, A.R. and Olefsky, J.M. (1999). The functional role of CrkII in actin cytoskeleton organization and mitogenesis. *J Biol Chem*. 274, 3001-3008.
- Noguchi, T., Matozaki, T., Inagaki, K., Tsuda, M., Fukunaga, K., Kitamura, Y., Kitamura, T., Shii, K., Yamanashi, Y. and Kasuga, M. (1999). Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration. *EMBO J*. 18, 1748-1760.
- Nolan, K.M., Barrett, K., Lu, Y., Hu, K.Q., Vincent, S. and Settleman, J. (1998). Myoblast city, the *Drosophila* homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes. *Genes Dev*. 12, 3337-3342.
- Obenauer, J.C., Cantley, L.C. and Yaffe, M.B. (2003). Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res*. 31, 3635-3641.
- Önel, S.F., Bolke, L. and Klämbt, C. (2004). The *Drosophila* ARF6-GEF Schizo controls commissure formation by regulating Slit. *Development* 131, 2587-2594.

- Önel, S.-F. (2009). Actin regulators take the reins in *Drosophila* myoblast fusion. *Cent Eur Jour Biol.* 4, 11-18.
- Önel, S.F. und Renkawitz-Pohl, R. (2009). FuRMAS: triggering myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Dyn.* 238, 1513-1525.
- Okada, S. and Pessin, J.E. (1997). Insulin and epidermal growth factor stimulate a conformational change in Rap1 and dissociation of the CrkII-C3G complex. *J Biol Chem.* 272, 28179-28182.
- Pastink, A., Heemskerk, E., Nivard, M.J., van Vliet, C.J. and Vogel, E.W. (1991). Mutational specificity of ethyl methanesulfonate in excision-repair-proficient and -deficient strains of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet.* 229, 213-218.
- Paululat, A., Breuer, S. and Renkawitz-Pohl, R. (1999). Determination and development of the larval muscle pattern in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 296, 151-160.
- Paululat, A., Burchard, S. and Renkawitz-Pohl, R. (1995). Fusion from myoblasts to myotubes is dependent on the rolling stone gene (rost) of *Drosophila*. *Development.* 121, 2611-2620.
- Petruzzelli, L., Takami, M. and Herrera, R. (1996). Adhesion through the interaction of lymphocyte function-associated Antigen-1 with intracellular Adhesion molecule-1 induces tyrosine phosphorylation of p130cas and its association with c-CrkII. *J Biol Chem.* 271, 7796-7801.
- Pontrelli, L., Sidiropoulos, K.G. and Adeli, K. (2004). Translational control of *apolipoprotein B* mRNA: regulation via cis elements in the 5' and 3' untranslated regions. *Biochemistry.* 43, 6734-6744.
- Puntervoll, P., Linding, R., Gemünde, C., Chabanis-Davidson, S., Matningsdal, M., Cameron, S., Martin, D.M.A., Ausiello, G., Brannetti, B., Constantini, A., Ferre, F., Maselli, V., Via, A., Cesareni, G., Diella, F., Superti-Furga, G., Wyrwicz, L., Ramu, C., McGuigan, C., Gudavalli, R., Letunic, I., Bork, P., Rychkewski, L., Küster, B., Helmer-Citterich, M., Hunter, W.N., Aasland, R. und Gibson, T. J. (2003). ELM server: a new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res.* 31, 3625-3630.
- Radhakrishna, H., Klausner, R.D. and Donaldson, J.G. (1996). Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *J Cell Biol.* 134, 935-947.

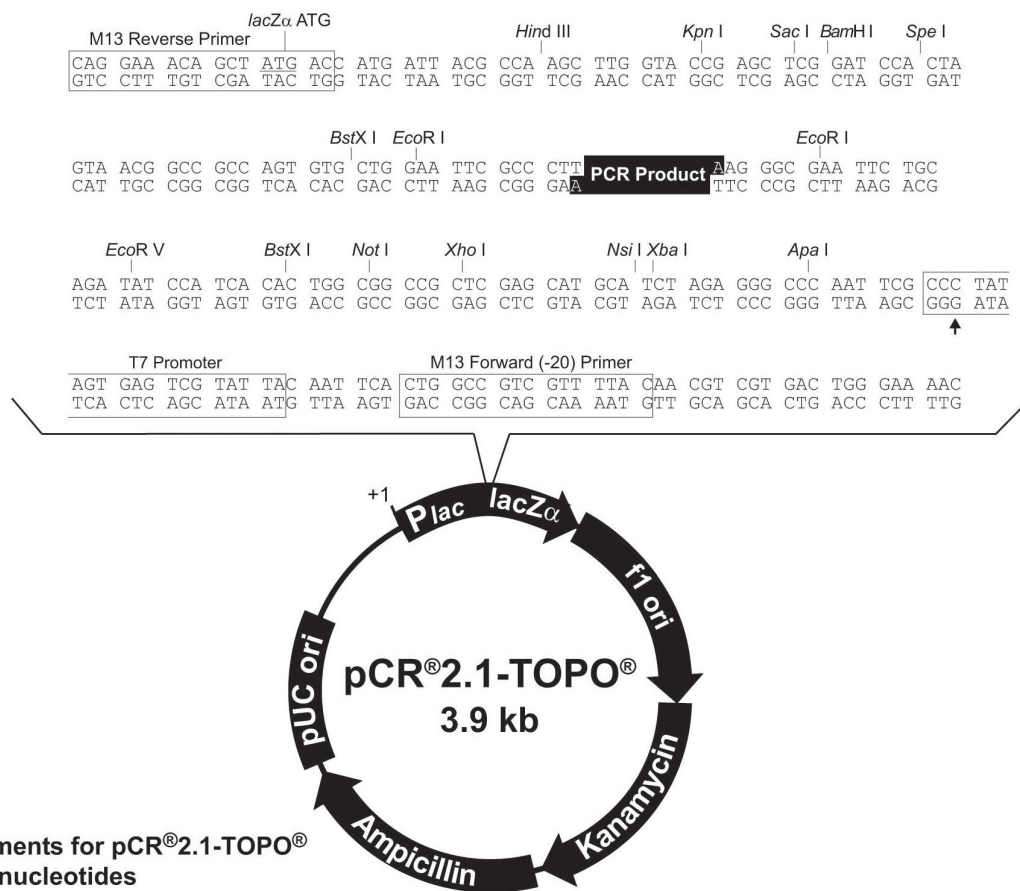
- Raitano, A.B., Whang, Y.E. and Sawyers, C.L. (1997). Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1333, F201-216.
- Rash, J.E. and Fambrough, D. (1973). Ultrastructural and electrophysiological correlates of cell coupling and cytoplasmic fusion during myogenesis in vitro. *Dev Biol.* 30, 166-168.
- Rau, A., Buttgereit, D., Holz, A., Fetter, R., Doberstein, S.K., Paululat, A., Staudt, N., Skeath, J., Michelson, A.M. and Renkawitz-Pohl, R. (2001). *rolling pebbles (rols)* is required in *Drosophila* muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion. *Development* 128, 5061-7503.
- Richardson, B.E., Beckett, K., Nowak, S.J. and Baylies, M.K. (2007). SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development* 134, 4357-4367.
- Rivero-Lezcano, O.M., Marcilla, A., Sameshima, J.H. and Robbins, K.C. (1995). Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol.* 15, 5725-5731.
- Rubin, G. and Spradling, A. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348-353.
- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M.V. and Bate M. (2000) *Drosophila* Dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* 102, 189-198.
- Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S.M., Michelson, A.M. and Bate M. (1995). Mutations in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development* 121, 1979-1988.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- San Martin, B., Ruiz-Gomez, M., Landgraf, M. and Bate, M. (2001). A distinct set of founders and fusion-competent myoblasts make visceral muscles in *Drosophila* embryo. *Development* 128, 3331-3338.

- Schäfer, G., Weber, S., Holz, A., Bogdan, S., Schumacher, S., Müller, A., Renkawitz-Pohl, R. and Onel, S.F. (2007). The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Biol.* 304, 664-674.
- Schröter, R.H., Lier, S., Holz, A., Bogdan, S., Klämbt, C., Beck, L. and Renkawitz-Pohl, R. (2004). *kette* and *blown* fuse interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*. *Development* 131, 4501-4509.
- Schröter, R.H., Buttgereit, D., Beck, L., Holz, A. and Renkawitz-Pohl, R. (2006). Blown fuse regulates stretching and outgrowth but not myoblast fusion of the circular visceral muscles in *Drosophila*. *Differentiation*. 74, 608-621.
- Schröter, R.H. (2006). Unterschiedliche Rollen des Adaptor-Proteins Blown fuse/Skap-Hom/Scap2 und des Aktin-Regulators Kette/Hem2/Nap1 während der somatischen und viszeralen Myogenese von *Drosophila melanogaster*. Dissertation Philipps-Universität Marburg.
- Schultz, J., Milpetz, f., Bork, P. and Ponting, C.P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 5857-5864.
- Shelton, C., Kocherlakota, K.S., Zhuang, S. and Abmayr, S.M. (2009). The immunoglobulin superfamily member Hbs functions redundantly with Sns in interactions between founder and fusion-competent myoblasts. *Development* 136, 1159-1168.
- Sicheri, F., Moarefi, I. and Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385, 602-609.
- Sickmann, A. (2005). Blow wird durch Phosphorylierung posttranslational modifiziert und interagiert nicht mit der Spleißvariante B des Adaptorproteins Crk. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg.
- Simeoni, L., Kliche, S., Lindquist, J. and Schraven, B. (2004). Adaptors and linkers in T and B cells. *Curr Opin Immunol.* 16, 304-313.
- Sossey-Alaoui, K., Li, X. and Cowell, J.K. (2007). c-Abl-mediated Phosphorylation of WAVE3 Is Required for Lamellipodia Formation and Cell Migration. *J. Biol. Chem.* 282, 26257-26265.
- Srinivas, B.P., Woo, J., Leong, W.Y. and Roy, S. (2007). A conserved molecular pathway mediates myoblast fusion in insects and vertebrates. *Nat Genet.* 39, 781-786.

- Stapleton, M., Liao, G., Brokstein, P., Yu, C., Champe, M., George, R., Guarin, H., Kronmiller, B., Pacleb, J., Wan, K., Park, S., Rubin, G.M. and Celniker, S.E. (2003). A *Drosophila* fulllength cDNA resource. *Genome Biology* 3, 1-8.
- Strünkelnberg, M., Bonengel, B., Moda, L.M., Hertenstein, A., de Couet, H.G., Ramos, R.G. and Fischbach, K.F. (2001). *rst* and its paralogue *kirre* act redandantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* 128, 4229-4239.
- Stute, C., Kesper, D., Holz, A., Buttgereit, D. and Renkawitz-Pohl, R. (2006). Establishment of cell type specific Gal4-driver lines for the mesoderm of *Drosophila*. *D.I.S.* 89, 111-115.
- Stylli, S.S., Stacey, T.T., Verhagen, A.M., Xu, S.S., Pass, I., Courtneidge, S.A. and Lock, P. (2009). Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation. *J Cell Sci.* 122, 2727-2740.
- Takahashi, F., Endo, S. Koijma, T. and Saigo, K. (1996). Regulation of cell-cell contacts in developing *Drosophila* eyes by *Dsrc41*, a new, close relative of vertebrate *c-src*. *Genes Dev.* 10, 1645-1656.
- Takenawa, T. and Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J. Cell Sci.* 114, 1801-1809.
- Takenawa, T. and Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 37-48.
- Togni, M., Swanson, K.D., Reimann, S., Kliche, S., Pearce, A.C., Simeoni, L., Reinhold, D., Wienands, J., Neel, B.G., Schraven, B. and Gerber, A. (2005). Regulation of *in vitro* and *in vivo* immune functions by the cytosolic adaptor protein SKAP-HOM. *Mol Cell Biol.* 25, 8052-8063.
- Tomancak, P., Beaton, A., Weizmann, R., Kwan, E., Shu, S., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Hartenstein, V., Celniker, S.E. and Rubin, G.M. (2002). Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biol.* 3: E-Pub.
- Tweedie, S., Ashburner, M., Falls, K., Leyland, P., McQuilton, P., Marygold, S., Milburn, G., Osumi-Sutherland, D., Schroeder, A., Seal, R., Zhang, A. and FlyBase Consortium. (2009). FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res.* 37. D, 555-559.

- Van Vactor, D., Sink, H., Fambrough, D., Tsoo, R., Goodman, C.S. (1993). Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell*. 73, 1137-1153.
- von Rüden, M.F. (2009). Die Funktion und Regulation des PH-Domänen Proteins Blown fuse in der Myoblastenfusion von *Drosophila melanogaster* – Analyse der PH-Domäne und einer möglichen Phosphorylierung. Bachelorarbeit Philipps-Universität Marburg.
- Wadsworth, S.C., Madhavan, K. and Bilodeau-Wentworth, D. (1985). Maternal inheritance of transcripts from three *Drosophila src*-related genes. *Nucleic Acids Res.* 13, 2153-2170.
- Wakelam, M. (1985). The fusion of myoblasts. *Biochem J.* 228, 1-12.
- Wang, H., Moon, E.Y., Azouz, A., Wu, X., Smith, A., Schneider, H., Hogg, N. and Rudd, C.E. (2003). SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates. *Nat Immunol.* 4, 366-374.
- Wang, H. and Rudd, C.E. (2008). SKAP-55, SKAP-55-related and ADAP adaptors modulate integrin-mediated immune-cell adhesion. *Trends Cell Biol.* 18, 486-493.
- Xu, W., Harrison, S.C. and Eck, M.J.(1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595-602.

9 Anhang



Comments for pCR®2.1-TOPO®
3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547
 M13 reverse priming site: bases 205-221
 Multiple cloning site: bases 234-357
 T7 promoter/priming site: bases 364-383
 M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
 f1 origin: bases 548-985
 Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
 Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
 pUC origin: bases 3136-3809

Abbildung 9.1: Der TOPO™-TA-Vektor zur Klonierung von Vorklonen und Transformation in kompetente *E. coli* Zellen

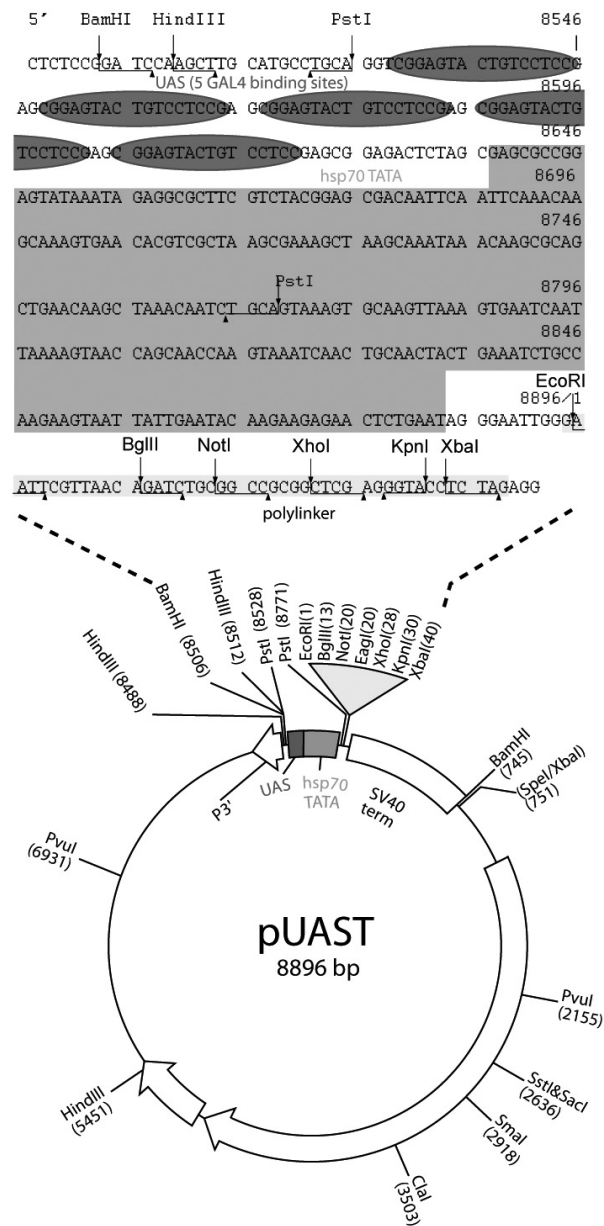
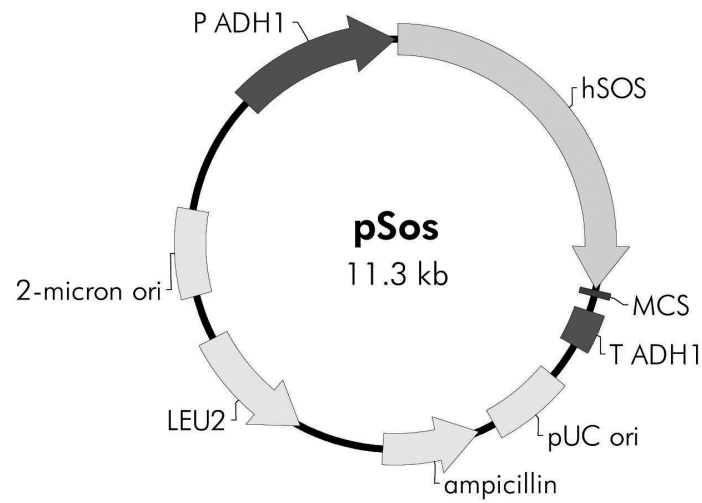


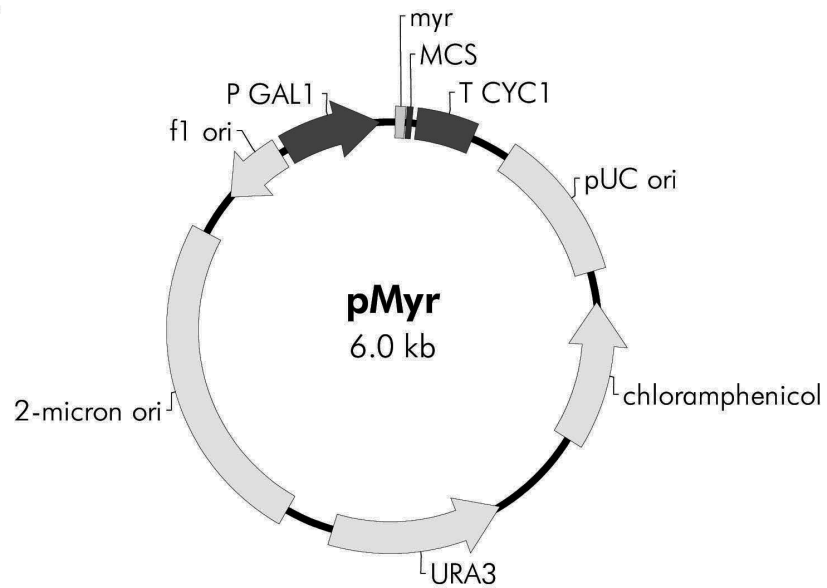
Abbildung 9.2: Der pUAST-Vektor für Keimbahntransformationen in *Drosophila* trägt fünf optimierte UAS-Bindestellen, eine *hsp70* TATA-Box, eine SV40-3'UTR und eine Polyadenylierungsstelle. Er kann zur Expression der klonierten Konstrukte mittels des UAS-Gal4-Systems verwendet werden,

pSos Vector
pSos Multiple Cloning Site Region
 (sequence shown 3201–3299)

end of hSos
 CCA AGG AAA ATT AGT TAT AGT AGG ATC CCC ATG GCC CGG GCG ACG TCG ACG...
 BamH I Nco I Srf I Aat II Sal I BssH II
 ... CGC GCA CGC GTG AGC TCG CGG CCG CCG CGG **T**TA ATT AAT TAA TTA ACC
 Mlu I Sac I Not I **Sac II** **Pac I** **Pac I**
 STOP STOP STOP STOP

Notes: The **Sac II** and **Pac I** sites in the pSos MCS (shown in bold) are not unique. A stop codon is present in all three reading frames.

Abbildung 9.3: Der pSos-Vektor für das Hefe-2-Hybridsystem des CytoTrap-Vektor Kits für die Köderproteine

pMyr Vector**pMyr Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 22–120)**

myristylation signal

ATG GGG AGT AGC AAG AGC AAG CCT AAG GAC CCC AGC CAG CGC CGG TCT AGA GAA TTC...

START

... GCC CGG GCC TCG AGG TCG ACT AAT TGA ATA ATA AGC TCT AGA

Restriction sites indicated above the sequence: Srf I, Sma I, Xho I, Sal I, Xba I, EcoR I.

STOP codons are indicated below the sequence: ACT AAT TGA ATA ATA AGC.

Notes: The **Xba I** sites in the pMyr MCS (shown in bold) are not unique. A stop codon is present in all three reading frames.

Abbildung 9.4: Der pMyr-Vektor für das Hefe-2-Hybridsystem des CytoTrap-Vektor Kits für die Beuteproteine

Positive Controls

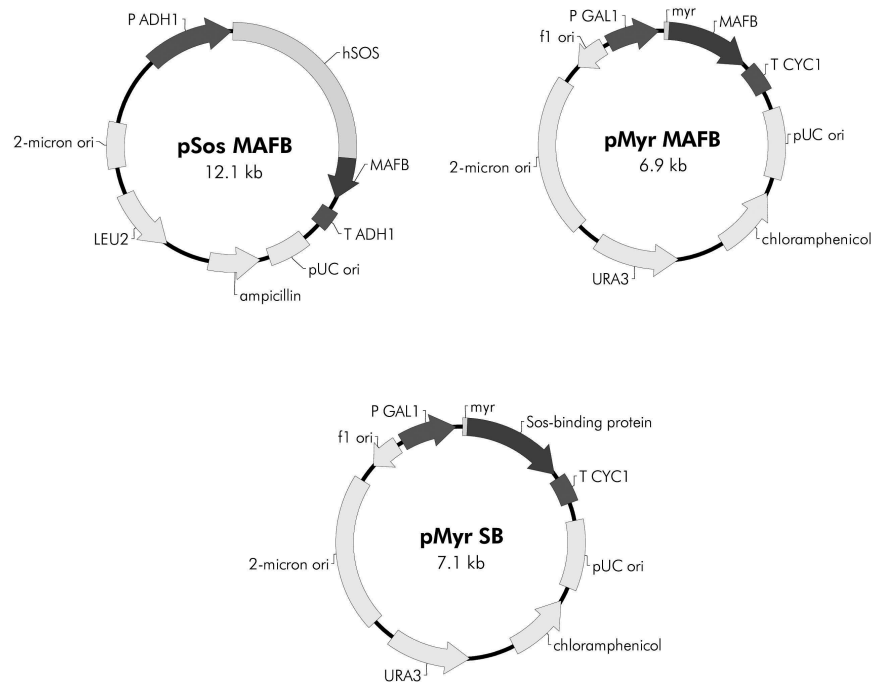


Abbildung 9.5: Die Positivkontrollen des CytoTrap-Vektor Kits für das Hefe-2-Hybridsystem: die Fusionsproteine interagieren miteinander.

Negative Controls

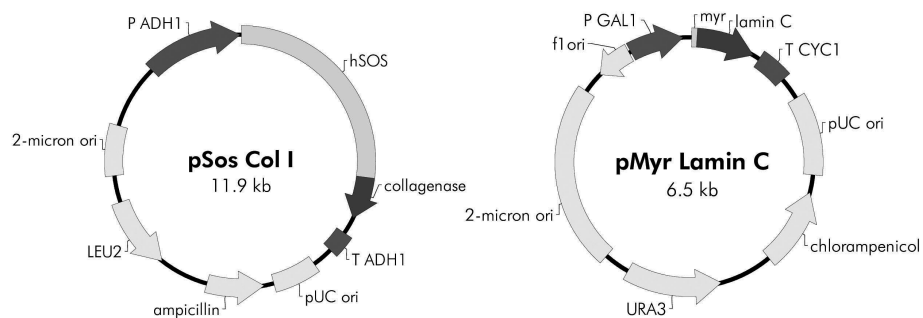
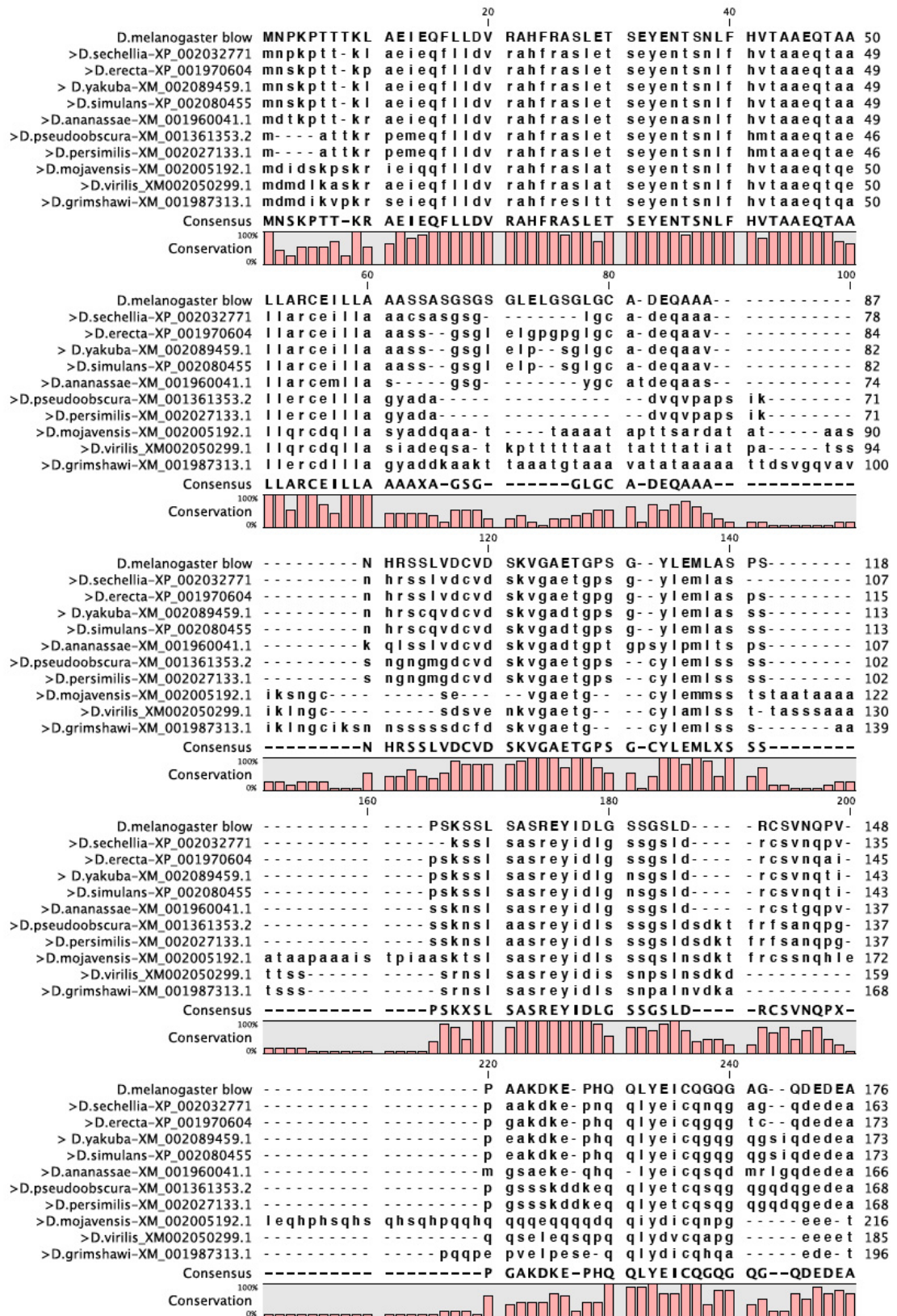
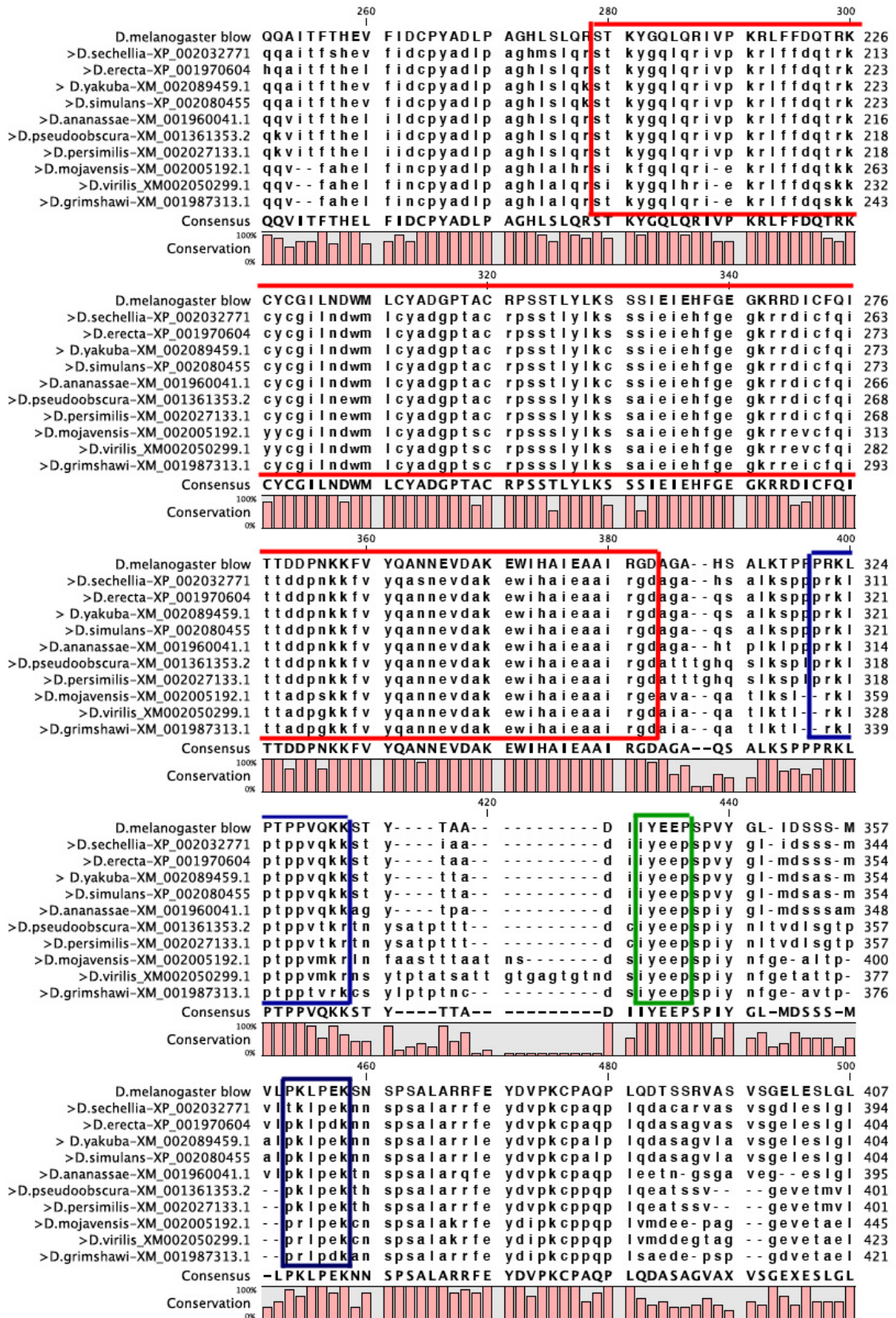
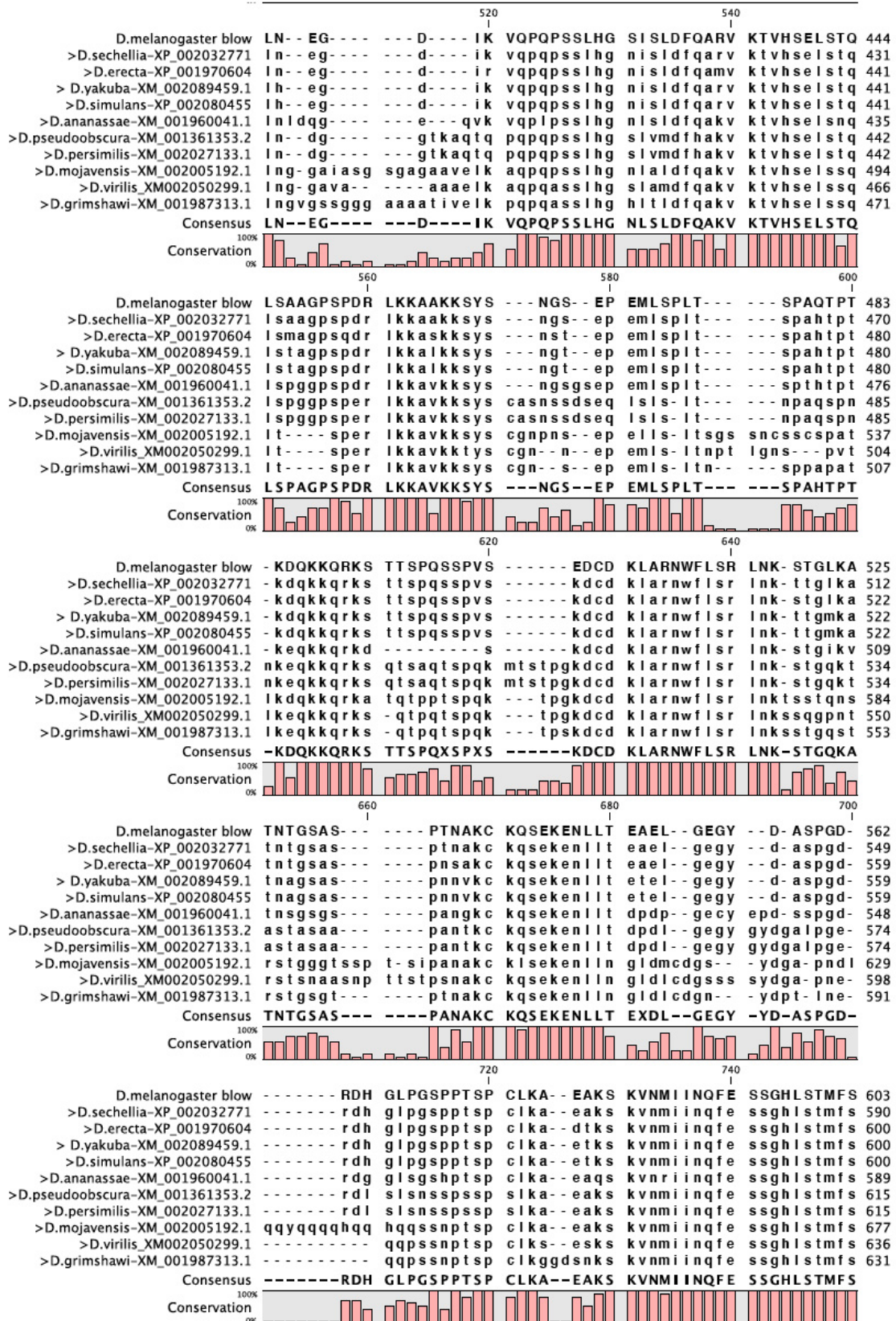


Abbildung 9.6: Die Negativkontrollen des CytoTrap-Vektor Kits für das Hefe-2-Hybridsystem: Die Fusionsproteine interagieren nicht miteinander.







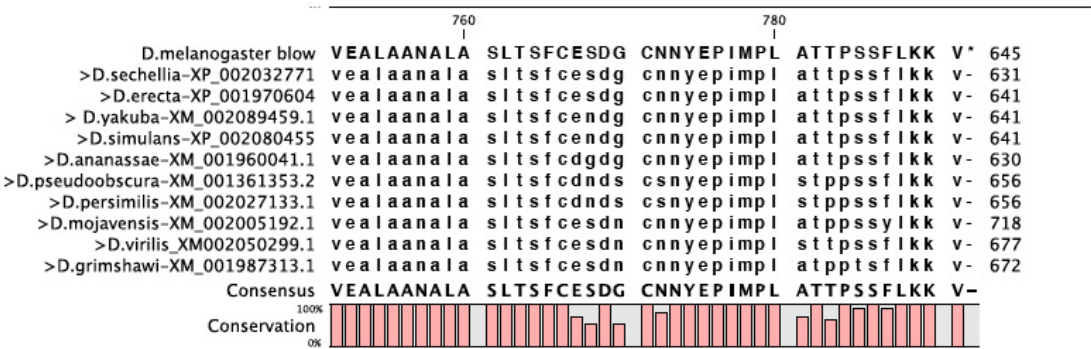
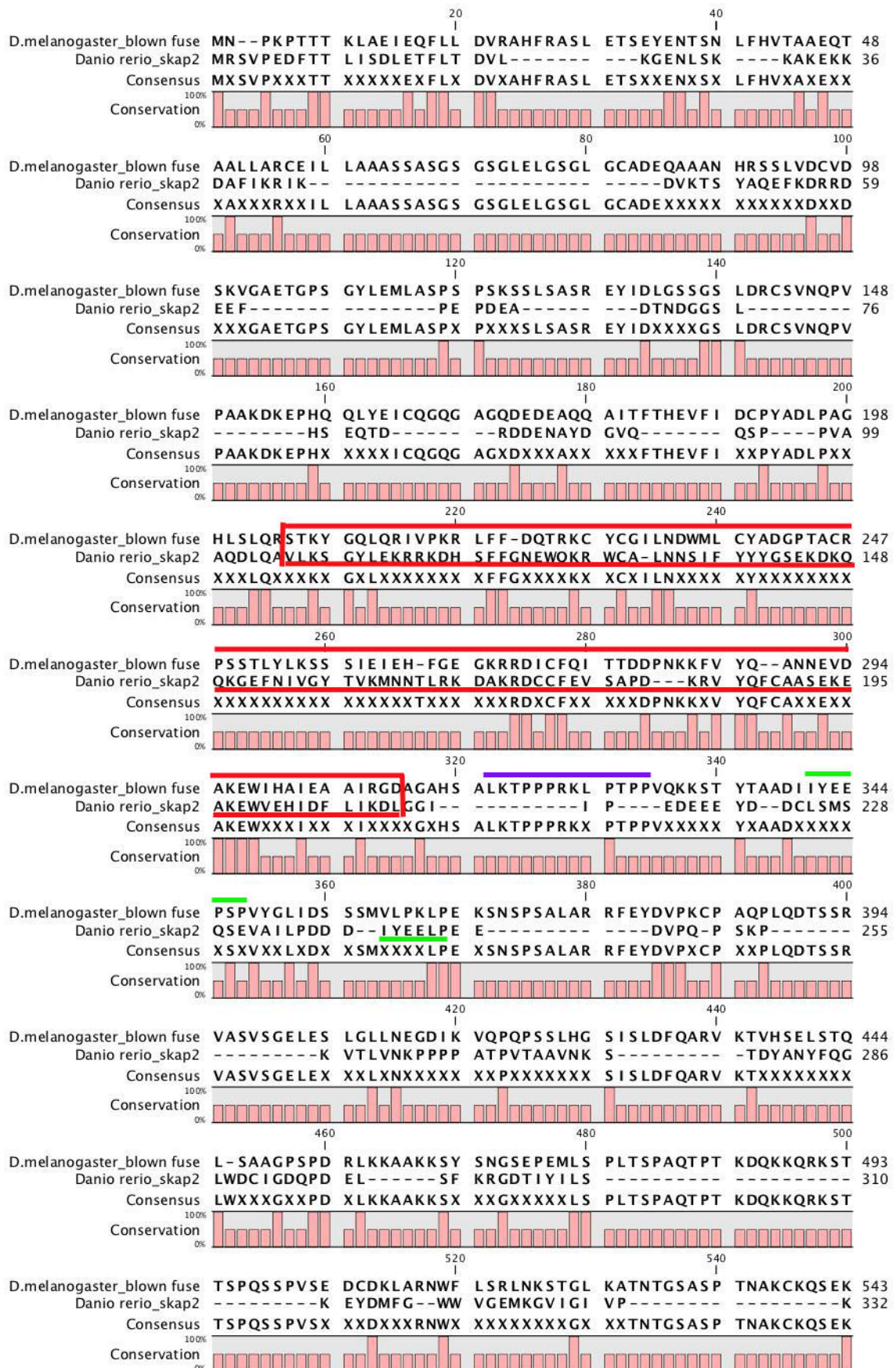


Abbildung 9.7: Alignment von Blow Homologen verschiedener *Drosophila* Spezies. Die rote Markierung zeigt die PH-Domäne an, während in blau die putativen SH3-Bindestellen und in grün das putative Abelson-Phosphorylierungsmotiv gezeigt sind.



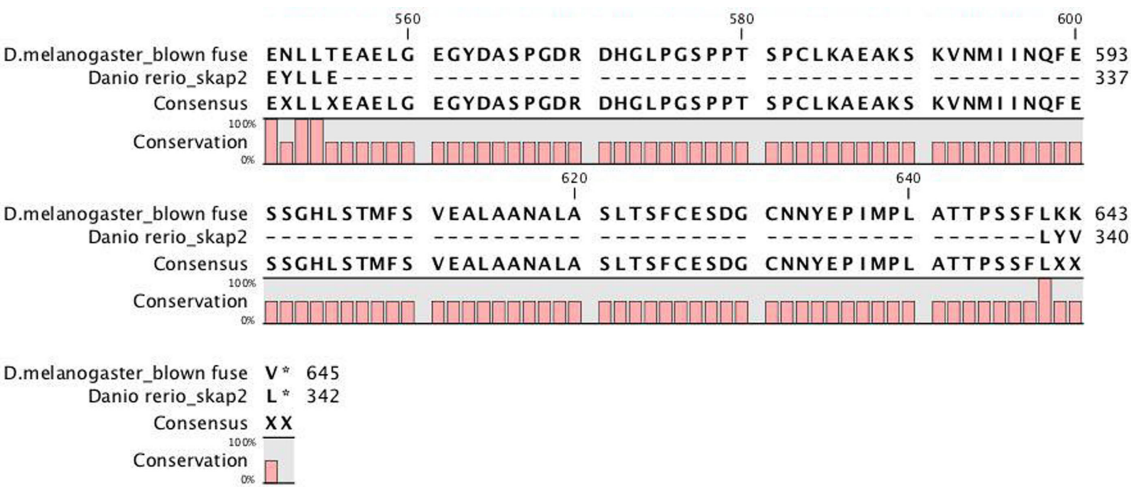
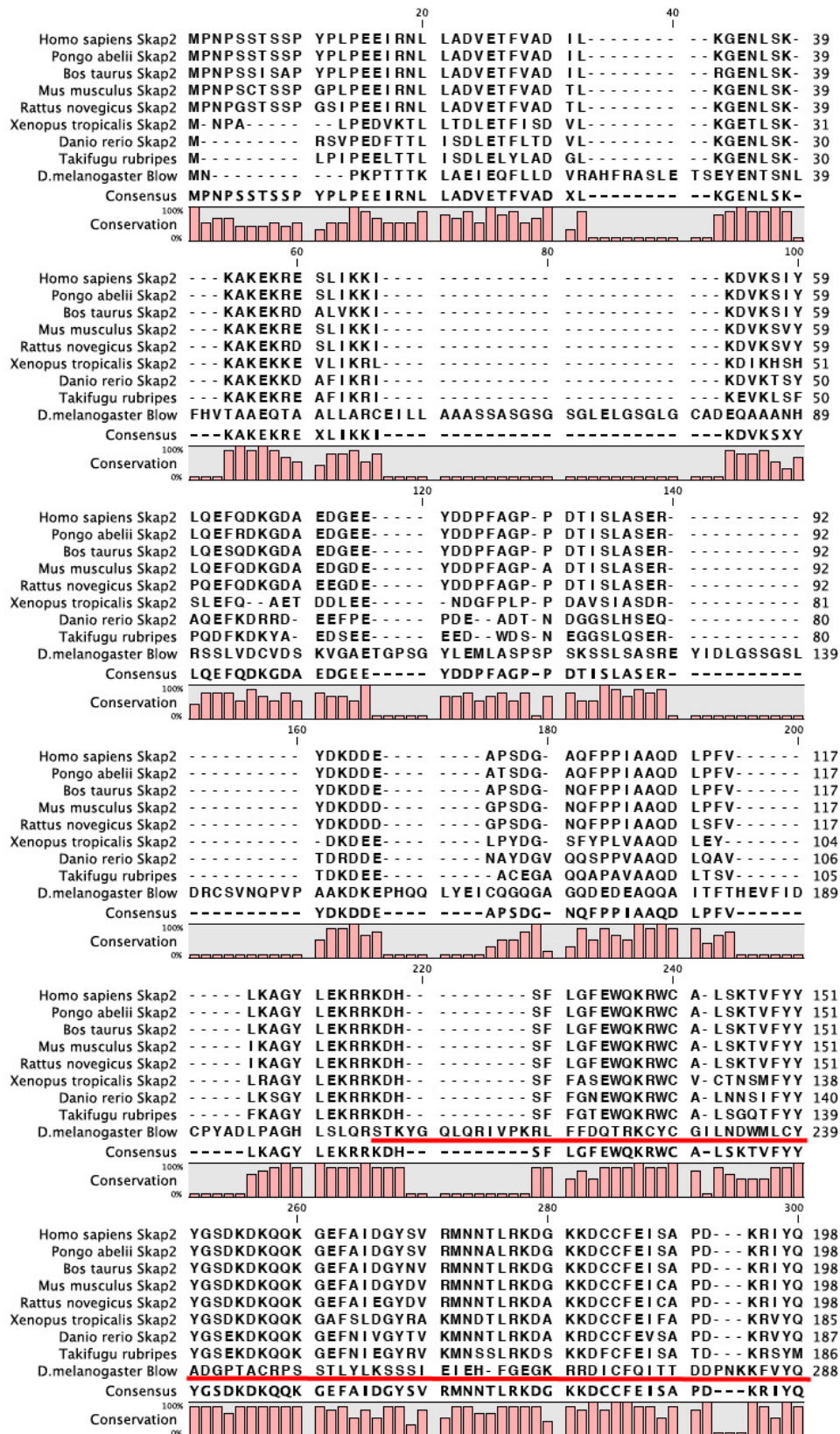
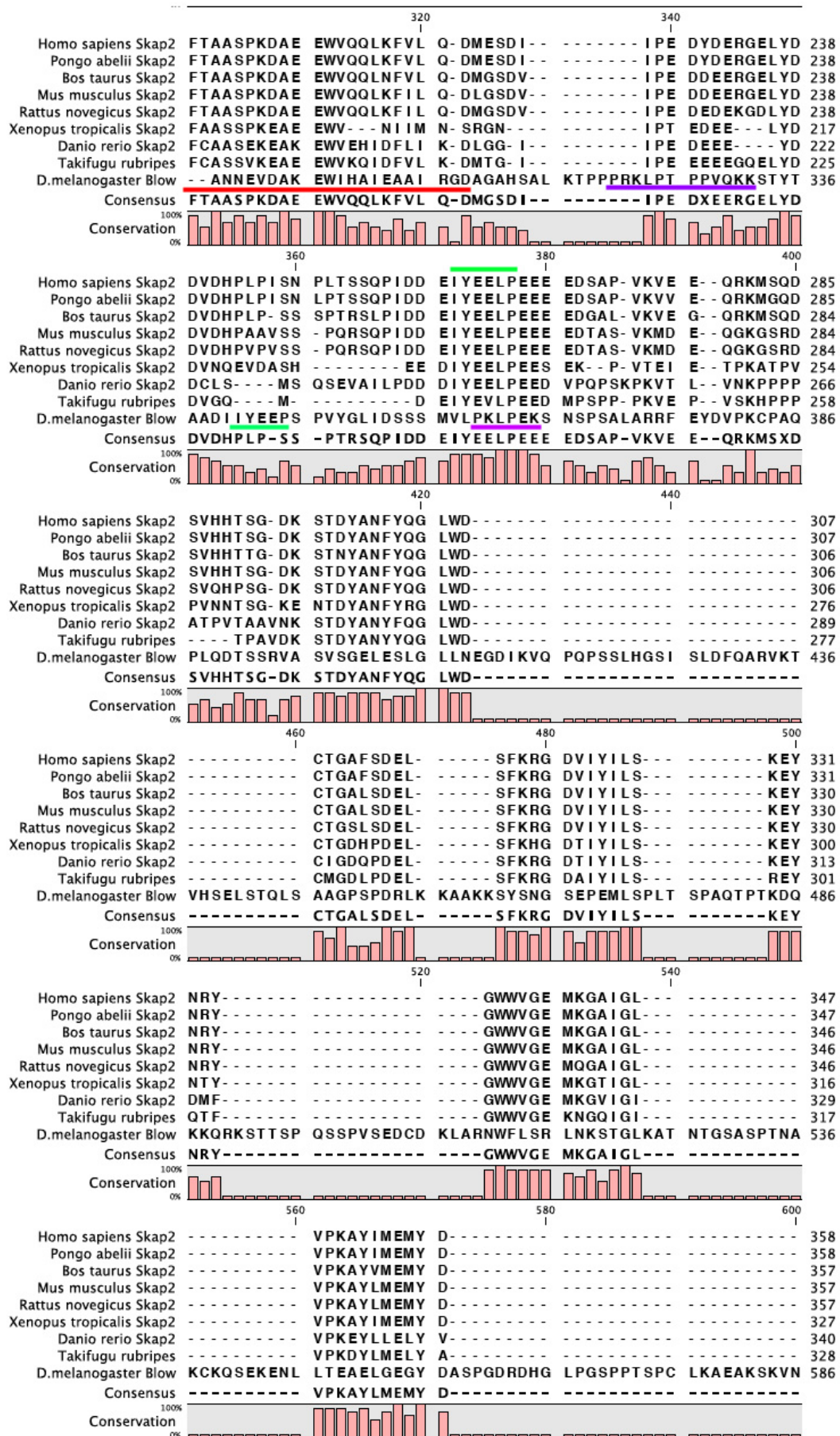


Abbildung 9.8: Alignment von Blow aus *Drosophila* und Skap2 aus Zebrafisch. Die rote Markierung zeigt die PH-Domäne an, während in violett die putative SH3-Bindestelle und in grün die Phosphorylierungsmotive gezeigt sind.





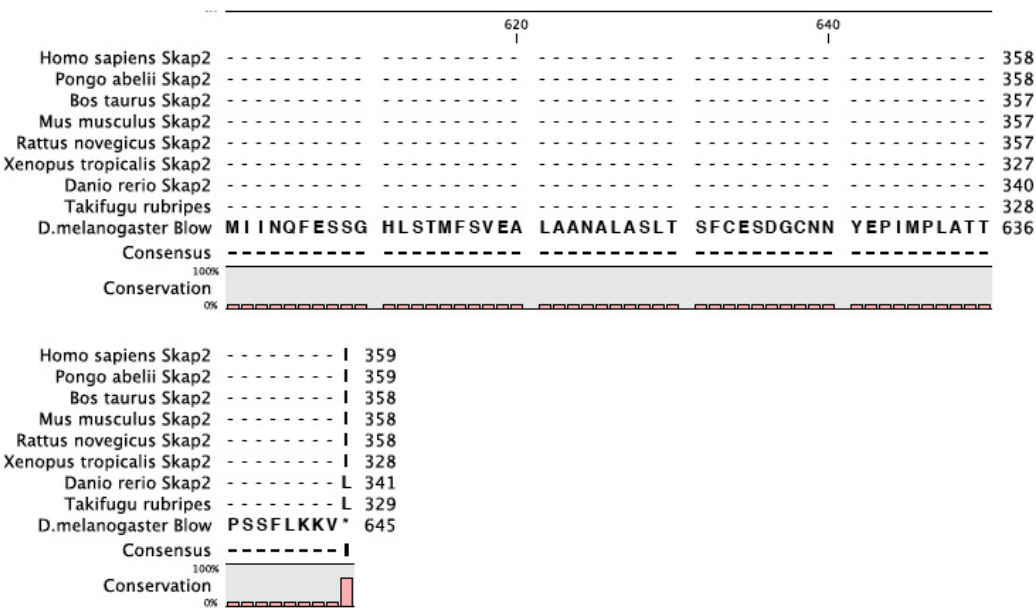


Abbildung 9.9: Alignment von Skap-Proteinen verschiedener Vertebraten und Blow aus *Drosophila*. Die PH-Domäne, putativen SH3-Bindestellen und die Phosphorylierungsstelle von Blow sind unterhalb des Alignments in rot, violett und grün eingezeichnet. Das Skap2-Phosphorylierungsmotiv um Tyrosin 241 ist oberhalb des Alignments in grün eingezeichnet.

10 Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Mösch danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Außerdem danke ich

- der gesamten AG Renkawitz-Pohl für das nette Arbeitsklima und für das gute Gefühl, sich bei Problemen an jeden der Gruppe wenden zu können.
- Ruth Hyland für die Durchführung der Mikroinjektionen.
- Detlev Buttgereit für die Hilfe bei den anti-Blow Färbungen.
- Martin von Rüden für die engagierte Unterstützung bei der Fliegenkreuzerei.
- Stephan Awe für den großartigen LaTeX-Header und die Bereitschaft, mir bei LaTeX-Problemen zur Seite zu stehen.
- Susanne, Bridlin, Katja, Loreen und Bettina für kritische Korrekturvorschläge
- meinen Freunden und Mitbewohnern für das Zuhören, die Ablenkungen und die schöne Zeit.
- der DFG (Re628/14-2/3), dem GRK1216 und der FAZIT-Stiftung für die Förderung dieser Arbeit.

Ein Dank gebührt meinen Eltern dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben. Meiner Schwester, meiner Oma und meinem Bruder danke ich für das Gefühl der 'Rückendeckung'.

Ich danke Micha dafür, dass er die Zeit mit mir durchgestanden hat.

11 Erklärung

ich versichere, daß ich meine Dissertation

Expressionen von verschiedenen Proteinversionen von Blown fuse sowie Skap2 im Embryo und die mögliche Rolle von Blown fuse in der Myoblastenfusion in *Drosophila melanogaster*

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mit ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient hat.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

(Angela Sickmann)

12 Lebenslauf

Geburtsdatum und -ort:	13.07.1979 in Siegen
Familienstand:	ledig
<hr/>	
ab 12/2005	Doktorarbeit im Labor von Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl. währenddessen: Mitgliedschaft im Graduiertenkolleg „Intra- und Intercellular Transport and Communication“, Betreuung von zwei Studenten im Labor und einigen Praktika. Besuch von Fachkonferenzen in Münster, Wien und Marburg.
(10/2005 – 11/2005	Wandern in Nordspanien)
19/2002 – 09/2005	Hauptstudium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg. Prüfungen in den Fächern Entwicklungsbiologie, Genetik, Biochemie und Virologie (Zusatzfach) Diplomarbeit im Fach Entwicklungsbiologie bei Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl.
10/2001 – 06/2002	Auslandsjahr an der University of Edinburgh
10/1999 – 09/2001	Grundstudium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
08/1990 – 06/1999	Peter-Paul-Rubens-Gymnasium der Stadt Siegen; Abitur mit den Leistungskursen Deutsch und Englisch
08/1986 – 06/1990	Grundschule: Diesterwegschule in Siegen